Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Producción de antígenos y anticuerpos de interés veterinario en plantas transplastómicas de tabaco

Lentz, Ezequiel Matías

2011

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

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

Cita tipo APA:
Lentz, Ezequiel Matías. (2011). Producción de antígenos y anticuerpos de interés veterinario en plantas transplastómicas de tabaco. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Lentz, Ezequiel Matías. "Producción de antígenos y anticuerpos de interés veterinario en plantas transplastómicas de tabaco". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

"PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS DE INTERÉS VETERINARIO EN PLANTAS TRANSPLASTÓMICAS DE TABACO".

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires

en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS.**

Lic. Ezequiel Matías Lentz

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

Director asistente: **Dr. Andrés Wigdorovitz.**

Consejero de estudios: Dr. Jorge Prometeo Muschietti.

Lugar de trabajo:

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular

(INGEBI - CONICET)

Buenos Aires, 2011

Dedicada a mis padres, y a mi hermano Leónidas.

Agradecimientos

Este trabajo fue posible en primer lugar gracias al apoyo incondicional que recibí de mi Familia, y por eso a ellos les dedico esta Tesis. Nunca voy a terminar de agradecerles a mis padres Leonardo y Susana, y a mi hermano Leónidas. Este objetivo que se cumple, *es un logro de los cuatro*, ya que estamos conectados simbióticamente y nos ayudamos en todo momento. Le agradezco profundamente a mi Director, quién no sólo es un excelente profesional, sino también una persona realmente admirable, humilde y con un gran corazón. Me considero afortunado por formar parte de un grupo muy humano, con quienes compartí muchas horas de trabajo, al mismo tiempo aprendiendo y haciendo amigos. Por eso les agradezco a mis compañeros directos de laboratorio: Mauro, Euge, Sonia y Vir, y también a los integrantes del antiguo grupo PAPA: Nico F, Naty M, Naty F, Pau, Patri, Mery, Serge, Sil, Blanca, Laila, Nico M y Mer.

Los resultados que se presentan en esta Tesis surgen de una colaboración muy fluida con el grupo dirigido por el Dr. Andrés Wigdorovitz, mi co-Director, en el Instituto de Virología del INTA-Castelar. Compartimos reuniones, resultados, congresos, y afortunadamente premios y publicaciones. En todo momento me hicieron sentir parte de su grupo, y el trabajo se facilitó significativamente gracias a su profesionalismo y buena predisposición. Entonces, les agradezco muchísimo a Andrés, Marina, Majo, Demian, Mirco, Sol, Ana, Andrea, Diego y Ayelén. Les agradezco también a la Dra. Parreño y Lore. Fue realmente un placer trabajar en colaboración con todos Ustedes y espero que podamos seguir trabajando en el futuro.

Es tan agradable y ayuda tanto trabajar en un ambiente cordial, de compañerismo y respeto mutuo. En el INGEBI recibí la ayuda numerosas veces de Becarios e Investigadores de otros laboratorios. Ayuda que vino en forma de consejos, información, y de reactivos que nos facilitaron muy amablemente. Cuando los recursos son limitados, esta ayuda es fundamental y me alegra muchísimo haber sido testigo directo en reiteradas ocasiones de estas situaciones en las cuales la generosidad y la buena voluntad se pusieron de manifiesto en todo su esplendor. Por esta razón es que les agradezco a todos los integrantes del Instituto: Directivos, Investigadores, Becarios, y al Personal de Apoyo y Secretaría, que nos tienen tanta paciencia y que nos ayudan en el día a día con tantos detalles imposibles de numerar. Especialmente le agradezco a José, Mary, Gladys, Norma, Ruben, Aldo e Irma. En los labos, en particular le quiero agradecer a Diego, Tamara, Romi, Gaby, Agus, y al Dr. Muschietti; a Leti, Laura, Ale, Silvia, Margarita y Leandro, del grupo del Dr. Levin; a Santi y Ceci del grupo del Dr. Calvo, a todos "los químicos" del grupo del Dr. Iribarren, a Caro, Sandra y Vero del grupo de la Dra. Ulloa y a los integrantes de los grupos dirigidos por la Dra. Tellez, el Dr. Erijman y la Dra. Flawiá. Muy especialmente a la Dra. Cristina Paveto, quién siempre tiene tan buena predisposición y una sonrisa para todos los que recién empezamos en este trabajo. A su vez, le agradezco a Marina, Laura y Yani por la amistad y compañerismo que se remonta a nuestros años de estudiantes de biología.

En la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, le agradezco al Dr. Alberto Kornblihtt por su apasionado desempeño como Docente e Investigador. Disfruté tanto de la

materia IBMC, y eso fue decisivo para elegir mi profesión. En el IBYME, le agradezco muchísimo al Dr. Leonardo Bussmann, quien siempre nos ayudó y nos ayuda día a día desinteresadamente, y a todos los integrantes de su laboratorio. A los compañeros de mi primer laboratorio: Flor, July, Nico, Nieves y Clarisa; al laboratorio de la Dra. Luthy: LiliT, Ceci, Ari y Gaby, de la Dra. Barañao: Marie, Carli, Gaby y Analía, y a la Dra. Chasseing. Al laboratorio del Dr. Juan Carlos Calvo y la Dra. Lucrecia Calvo, especialmente a Marina, y también a la Dra. Cuasnicú y su grupo, en especial a Débora, Julieta y Nadia.

Le agradezco a CONICET y a la Agencia por haber financiado mi beca.

En este último párrafo quiero agradecer a más amigos de la vida y personas que me han ayudado directa e indirectamente para llevar a cabo este trabajo: Caro, una amiga y prácticamente *una hermana*, Capi, Edu, Ro, Naty, Su, Diana, Franco, Nico, y Mary y Agus, amigas y primas al mismo tiempo. Gracias a mi médica de toda la vida y amiga de la familia: la Dra. Silvana Monteleone. Gracias como siempre al Dr. Gamboa, el Dr. Gutierrez, la Sra. Enfermera Nelly, Srta. Verónica y todo el grupo de pediatría de la Fundación Favaloro. Finalmente, le agradezco a mucha gente que no me conoce y que sin embargo me acompañó con su música o sus palabras, radio o revista de por medio: gracias Björk Guðmundsdóttir, Juana Molina, gracias Negra Vernaci, Torto, Barragán y Gillespi, gracias a la gente de Barcelona, gracias Ale Dolina y gracias al genial Adolfo Castelo que nos sonrie desde arriba.

Desde mi corazón con aleación de titanio, les digo muchísimas gracias a todos.

"Producción de antígenos y anticuerpos de interés veterinario en plantas transplastómicas de tabaco".

En esta Tesis Doctoral, se evaluó la factibilidad de utilizar plantas transplastómicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) para la producción de proteínas de interés en medicina veterinaria: dos antígenos virales y un anticuerpo de camélido de cadena simple (VHH). La primera proteína producida en este sistema consistió en una fusión entre un epítope inmunogénico de la proteina VP1 del virus de la fiebre aftosa y la enzima β-glucuronidasa (VP-βGUS). Se generaron plantas transplastómicas, las cuales fueron caracterizadas a nivel molecular. La proteína heteróloga se acumuló de un modo importante en los cloroplastos de las plantas transformadas: hasta el 51% de las proteínas solubles totales (PST) (8 mg/g de tejido fresco [TF]), conservando su actividad enzimática e inmunogenicidad. Los niveles de expresión observados resultaron claramente mayores a los obtenidos previamente en plantas transgénicas nucleares utilizando la misma construcción. A pesar de estos altos niveles de expresión, el fenotipo de las plantas transplastómicas resultó ser indistinguible del de las plantas *wild-type*. Esta prueba de concepto con resultados alentadores nos permitió avanzar en la producción de otras moléculas mediante este sistema.

El segundo antígeno expresado fue VP8*, una proteína no glicosilada de la cápside de rotavirus bovino (RVB). Se utilizó una versión del vector que permite la acumulación de VP8* en el estroma y se generaron dos construcciones adicionales, una para expresarla como una fusión a la β-glucuronidasa (GUS-E-VP8*), y otra para dirigirla al lúmen de los tilacoides (str-VP8*). VP8* se acumuló como agregados insolubles en el estroma de los cloroplastos y pudo ser solubilizada parcialmente por sonicación. Se obtuvieron extractos de VP8* utilizando la fracción soluble, donde VP8* representaba el 4% de las PST (250 μg/g TF). Al extraerse VP8* a partir de la fracción insoluble sin incluir el paso de sonicación, fue posible enriquecer la preparación en la proteína recombinante, eliminar la nicotina, y mejorar el rendimiento al obtenerse 500 μg/g TF. La proteína VP8* obtenida a partir de ambas fracciones resultó ser inmunogénica y protectiva contra el virus en el modelo del ratón lactante. Las estrategias alternativas para la expresión de VP8* no fueron exitosas. GUS-E-VP8* se acumuló como una proteína soluble en el estroma del cloroplasto, pero en niveles significativamente menores que VP8*. La construcción str-VP8* permitió la translocación de VP8* al lúmen de los tilacoides, pero se observó una proteólisis no esperada de la proteína, y la presencia de una forma truncada de la misma. Estos resultados sugieren que la acumulación de VP8* en el estroma del cloroplasto es favorecida por su insolubilidad, que la protegería del ataque proteolítico.

La tercera molécula expresada fue el VHH clon 3B2 dirigido contra un epítope conformacional de la proteína VP6 de RVB. Para la expresión de este nanoanticuerpo también se evaluaron tres estrategias: expresión de VHH en el estroma, redirección al lúmen de los tilacoides (pep-VHH) y fusión a la enzima β-glucuronidasa (GUS-E-VHH). Todas las líneas de plantas transplastómicas expresando VHH mostraron un fenotipo heteroplástico. El análisis molecular confirmó la heteroplastía en líneas que habían sido regeneradas en medio selectivo al menos tres veces. La proteína VHH se acumuló en niveles bajos, los cuales se acercaban al límite de la detección por la técnica de *western blot*. La expresión se mejoró significativamente tanto en las plantas pep-VHH (2,5% de las PST; 60 μg/g TF) como en las GUS-E-VHH (3% de las PST; 70 μg/g TF), aunque en este último caso se observaron productos de degradación. Las plantas pep-VHH homoplásticas tenían un fenotipo clorótico que se intensificaba con la mayor iluminación. Los resultados obtenidos muestran la dificultad de expresar este VHH en cloroplastos y sugieren un efecto tóxico del transgén. La redirección al lúmen de los tilacoides favorecería la estabilidad de esta proteína heteróloga, lo cual es consistente con su expresión exitosa en *E. coli* cuando se expresa en el periplasma bacteriano.

Los resultados presentados en este trabajo aportan evidencias que promueven el uso y optimización de plantas transplastómicas como biorreactores, para llegar a ser alternativas rentables y concretas de uso en la industria.

Palabras claves:
Plantas transplastómicas; biorreactores; *Nicotiana tabacum*; antígenos; fiebre aftosa; rotavirus bovino; VHH.

Abstract

"Production of antigens and antibodies of veterinary interest in tobacco transplastomic plants".

In this PhD Thesis, we evaluated the feasibility of using transplastomic plants (*Nicotiana tabacum*) for the production of proteins of interest in veterinary medicine: two viral antigens and a camelid single-chain antibody (VHH). The first protein produced in this system was a translational fusion of an immunogenic peptide from VP1 of foot-and-mouth disease virus and the enzime β-glucuronidase (VP-βGUS). Transplastomic plants engineered to express the aforementioned construction were characterized at the molecular level. The heterologous protein accumulated up to 51% of the total soluble leaf protein (TSP), or 8 mg/g of fresh tissue (FT), while retaining its enzymatic activity and immunogenicity. The observed expression levels were clearly higher than those obtained previously in nuclear transgenic plants, using the same construction. Despite these high levels of expression, the phenotype of the transplastomic plants was indistinguishable from that of wild-type plants. This proof of concept with encouraging results, allowed us to continue evaluating this system for the production of other recombinant proteins.

The second antigen expressed was VP8*, a non-glycosilated capside protein from bovine rotavirus (BRV). Two additional constructions were used to express it in the chloroplast stroma as a β-glucuronidase fusion (GUS-E-VP8*), and to accumulate it in the thylakoid lumen (str-VP8*). VP8* formed insoluble aggregates in the stroma and was partially solubilized by sonication. In the soluble extracts obtained from VP8* transplastomic plants, the recombinant protein represented 4% of the TSP (250 μg/g FT). The insoluble fraction from these plants was highly enriched in VP8*, devoid of nicotine, and contained 500 μg/g FT. The protein from both fractions was immunogenic and conferred protection against the virus in the suckling mouse model. The alternative strategies for VP8* expression were unsuccessful. GUS-E-VP8* accumulated as a soluble protein at barely detectable levels. The construction str-VP8* allowed translocation of VP8* into the thylakoid lumen, but the protein was processed in an unexpected manner. These results suggest that VP8* accumulation in the chloroplast stroma is boosted by its insolubility, which would protect the recombinant protein from proteolytic attack and degradation.

The third molecule expressed was the VHH clone 3B2 directed against a conformational epitope of the VP6, an inner capsid protein of BVR. This nanobody was expressed using three strategies: accumulation in the stroma by itself (VHH) or as a fusion to the β-glucuronidase (GUS-E-VHH), and translocation into the thylakoid lumen (pep-VHH). All the transplastomic lines expressing the single-chain antibody presented an heteroplastic phenotype. Southern blot analysis confirmed the heteroplasmy of these plants. In VHH transplastomic plants the protein accumulated at very low levels, almost undetectable by western blot. Expression levels were improved in both pep-VHH (2,5% of TSP; 60 μg/g TF) and GUS-E-VHH plants (3 % of TSP; 70 μg/g TF), but in the latter case degradation products were observed. Homoplastic pep-VHH plants had a chlorotic phenotype, which was more intense when the plants were grown with higher illumination. These results show the difficulty of expressing this VHH in chloroplasts and suggest a toxic effect of the transgen on the plant. The redirection to the lumen of thylakoids favors the stability of the heterologous protein, which is consistent with its successful expression in *E. coli* when it is directed to the bacterial periplasm.

The results presented in this work support the use and optimization of transplastomic plants as biorreactors, in order to become concrete industrial alternatives.

Key words:
Transplastomic plants; molecular farming; *Nicotiana tabacum*; antigens; foot-and-mouth disease virus; bovine rotavirus; VHH.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción.....3

Objetivos.....9

RESULTADOS

Parte I: Expresión de un epítope de VP1 del virus de la fiebre aftosa fusionado a la *β*-glucuronidasa (VP-*β*GUS).

Introducción.....13

Subclonado de la secuencia de VP-*β*GUS al vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr......14

Obtención y caracterización molecular de plantas transplastómicas VP-*β*GUS......16

Comparación de la expresión entre plantas transgénicas nucleares y transplastómicas......21

Cuantificación de los niveles de expresión......22

Inmunogenicidad de la proteína recombinante VP-*β*GUS......26

Parte II: Expresión del antígeno VP8* de rotavirus bovino.

Introducción.....29

Desarrollo de las construcciones para la generación de plantas de tabaco que expresan VP8*......30

Obtención y caracterización molecular de plantas transplastómicas que expresan VP8*......32

Estabilidad de la proteína recombinante en las distintas hojas de las plantas transplastómicas....36

Solubilidad de las proteínas recombinantes......39

Mediciones de nicotina en los extractos proteicos de plantas VP8*......42

Localización subcelular de las proteínas recombinantes......42

Cuantificación de los niveles de expresión......44

Inmunogenicidad y protección de la proteína recombinante VP8* en el modelo murino......44

VP8* en hojas secas de plantas transplastómicas......47

Parte III: Expresión de un anticuerpo de camélido de cadena simple: VHH clon 3B2.

Introducción.....50

Desarrollo de las construcciones para la generación de plantas de tabaco transplastómicas que expresan VHH......51

Obtención y caracterización preliminar de plantas transplastómicas que expresan VHH......54

Fenotipo y caracterización molecular de plantas transplastómicas homoplásticas que expresan VHH......59

Localización subcelular de las proteínas recombinantes......68

Estabilidad de la proteína recombinante en las distintas hojas de plantas transplastómicas pep-VHH y GUS-EHH......69

Cuantificación de los niveles de expresión......72

Tratamiento de la proteína de fusión GUS-E-VHH con enteroquinasa......77

DISCUSIÓN

Discusión y conclusiones.....80

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas......90

Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*......90
Transformación de células competentes de *E. coli* por electroporación......90
Líneas de plantas......90
Aislamientos virales......91
Plásmidos......91
Secuencias:
VP-βGUS, VP8*, str-VP8*, GUS-E-VP8*, VHH, pep-VHH, GUS-E-VHH.....92
Oligonucleótidos iniciadores:
Cloro fw, Cloro rv, NDE5´P1, GUS3´, GUS5´, GUS-HindIII, VP8NdeI, VP8XbaI, HindIII-E-VP8, VHHNdeI, VHHXbaI, pepVHHNdeI, HindIII-E-VHH.....96
Metodología del ADN recombinante:
Preparación de ADN plasmídico.....97
Reacciones de ligación, cortes con enzimas de restricción y preparación de vectores e insertos.....97
Transformación genética de cloroplastos de plantas de tabaco:
Preparación y recubrimiento de partículas de oro con ADN plasmídico.....98
Bombardeo de hojas.....98
Selección de transformantes, cultivo in vitro y rusticación.....98
Análisis de ADN y ARN:
Identificación de plantas transplastómicas mediante PCR.....99
Ensayo de Southern blot.....99
Ensayo de northern blot.....100
Análisis de proteínas:
Extractos totales de proteínas de hojas de plantas de tabaco y de cultivos bacterianos.....101
Análisis de la solubilidad de la proteína recombinante en plantas que expresan VP8 y VHH*.....102
*Protocolo de extracción de la proteína VP8**.....102
Fraccionamiento subcelular para el estudio de la localización de las proteínas recombinantes en cloroplastos de plantas transplastómicas que expresan VP8 y VHH*.....102
Ensayo de SDS-PAGE y western blot.....103
Ensayo de actividad β-glucuronidasa.....104
Ensayo fluorométrico de actividad β-glucuronidasa.....105
Cuantificación de la acumulación de VP-βGUS y VP8 por SDS-PAGE*.....105
Cuantificación de la acumulación VP-βGUS, GUS-E-VHH y VHH por western blot.....106
Cuantificación de la acumulación de VP8 por ELISA*.....106
Inmunización de ratones con extractos de plantas VP-βGUS y análisis de la respuesta inmune.....106
Estudio de la inmunogenicidad y protección brindada por plantas transplastómicas VP8 en el modelo del ratón lactante*.....107
Medición de nicotina.....108
Tratamiento de GUS-E-VHH con enteroquinasa.....108
*Secado de plantas transplastómicas VP8**.....109

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía.....112

INTRODUCCIÓN

Introducción general

La agrobiotecnología ha tenido un gran impacto en el desarrollo humano, y ha experimentado un auge desde la posibilidad de manipular genéticamente numerosas especies vegetales. Esto representó un avance significativo en la obtención de cultivos mejorados respecto de los métodos convencionales, basados en el cruzamiento entre especies relacionadas filogenéticamente (Vasil, 2008). Como resultado de estos desarrollos, se lograron distintos productos que ganaron un lugar privilegiado en la agroindustria, como lo son las plantas tolerantes a herbicidas o resistentes a insectos.

Otra aplicación de las plantas transgénicas, es su utilización como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes, un concepto conocido como *molecular farming*. Las principales ventajas que ofrecen las plantas como biorreactores son el bajo costo asociado a la generación de biomasa, (producto de la naturaleza autotrófica de estas especies), la ausencia de toxinas bacterianas, contaminantes virales y secuencias oncogénicas (Mor y col., 1998; Walmsley y Arntzen, 2003), y la factibilidad de obviar la cadena de frio ya que la proteína de interés puede ser almacenada en tejidos donde las mismas son estables a temperatura ambiente (Sala y col., 2003; Streatfield y Howard, 2003; Lau y Sun, 2009).

Sin embargo, para que las plantas transgénicas puedan competir con otros sistemas de expresión, deben cumplir con un nivel mínimo de expresión. Este valor ha sido estimado en alrededor del 1% de la proteína recombinante respecto de las proteínas solubles totales del extracto de la hoja (Rybicki, 2009). Una estimación más reciente sugiere que un anticuerpo recombinante producido en plantas, debería tener como mínimo un rendimiento de 50 μg por gramo de tejido fresco, para que sea factible su purificación a escala comercial (Rybicki, 2010). Resulta claro entonces que mejorar los niveles de expresión en las plantas transgénicas representa uno de los mayores desafíos a vencer a fin de establecerlas como biorreactores capaces de competir con los sistemas tradicionales, como ser las bacterias y las levaduras (Floss y col., 2007).

En la década pasada, dos proteínas recombinantes producidas en maíz transgénico llegaron al mercado: la β-glucuronidasa y la avidina, para uso en investigación y diagnóstico, respectivamente (Menkhaus y col., 2004). A su vez, en el 2006 se aprobó en Estados Unidos la primera vacuna producida en células vegetales en suspensión contra el *Newcastle Disease Virus* (NDV), para ser utilizada en pollos (Vermij y Waltz, 2006). La aprobación de esta vacuna para uso veterinario pone en evidencia la menor exigencia de los organismos regulatorios sobre este tipo de productos respecto de aquellos destinados a la salud humana (Meeusen y col., 2007; Joensuu y col., 2008).

Actualmente se cuenta con dos metodologías ampliamente difundidas para la transformación nuclear de plantas. Una de ellas se basa en la introducción de genes al genoma nuclear mediante A*grobacterium tumefaciens*, y el otro método es la biobalística (figura 1). En ambos casos el transgén se incorpora al azar en el genoma nuclear, y comúnmente son varias copias del mismo las que se integran. En la transformación nuclear son frecuentes los casos de

silenciamiento transcripcional y post-transcripcional, y ambos mecanismos atentan contra la síntesis de la proteína heteróloga (Fagard y Vaucheret, 2000).

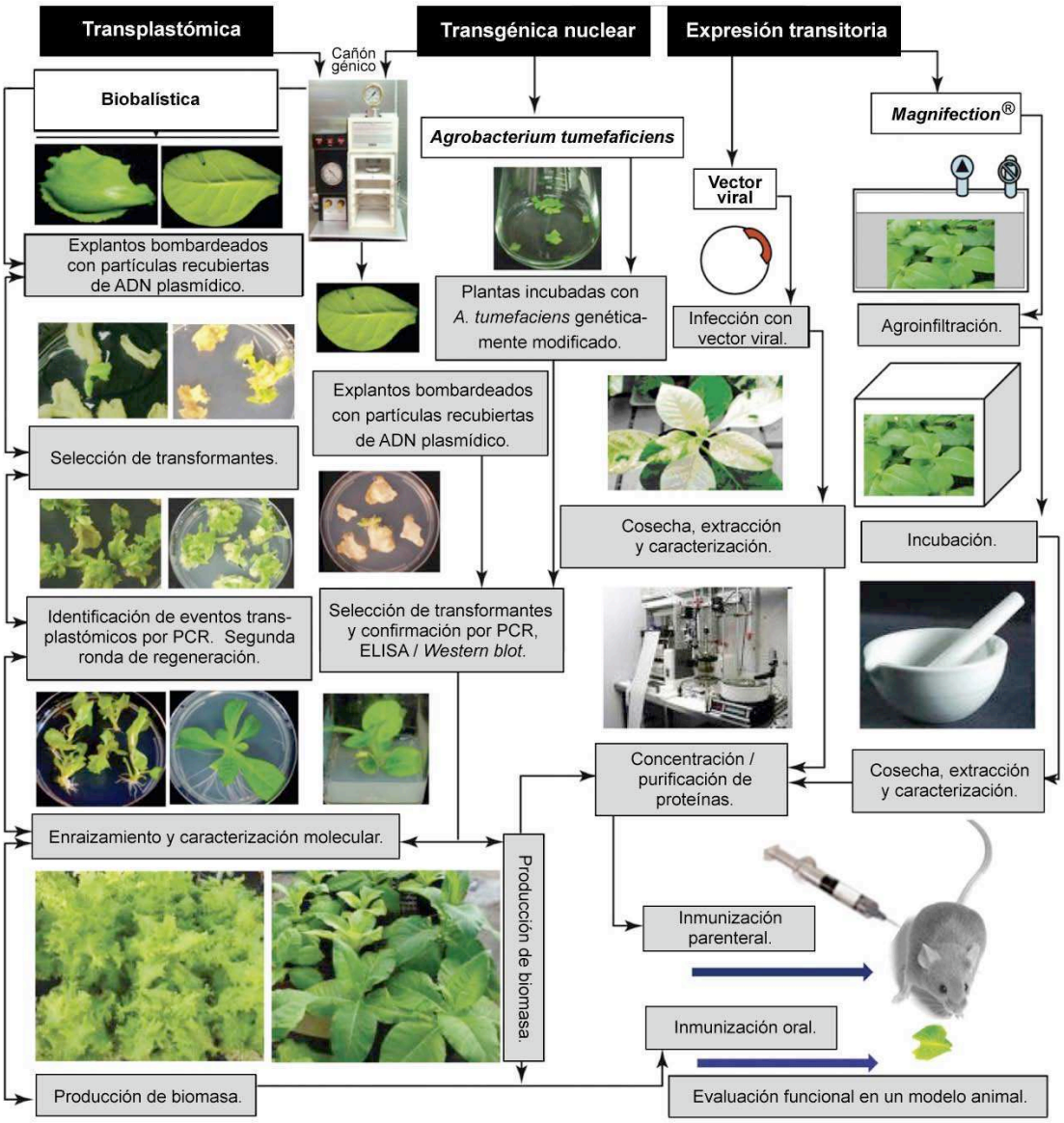

Figura 1. Metodologías de transformación genética de plantas para su aplicación en *molecular farming* destinado a vacunas. Representación esquemática de los distintos sistemas de producción de antígenos vacunales y su evaluación funcional en modelos animales. Se presentan como ejemplos las plantas de tabaco y lechuga (adaptado de Daniell y col., 2009a).

Otra opción para producir proteínas recombinantes en plantas, que no requiere del desarrollo y caracterización de eventos transgénicos, es la expresión transitoria mediante el uso de vectores virales y agroinfiltración. A su vez, estas alternativas han sido optimizadas mediante el uso conjunto de supresores del silenciamiento génico, vectores de última generación y la agroinfiltración de amplicones virales utilizando *A. tumefaciens*. Esta tecnología conocida como *magnifection*, permite obtener miligramos de proteína recombinante por gramo de hoja en menos de diez días (Gleba y col., 2005; Marillonnet y col., 2005; Lai y col., 2010). Debido a su alto rendimiento, se perfila como una de las metodologías favoritas para su aplicación en la industria.

Una variante de la transformación genética de plantas que ha permitido en numerosos casos producir proteínas recombinantes en altos niveles, consiste en incorporar el transgén en el genoma del cloroplasto (figura 2). De este modo la transcripción se realiza en el estroma del cloroplasto, y el mensajero es traducido por ribosomas plastídicos. En general, las plantas transgénicas en su genoma plastídico (transplastómicas) presentan mejores niveles de expresión respecto de las transgénicas nucleares, debido principalmente a la ausencia de efectos de posición (la transformación de cloroplastos ocurre en una región predeterminada por recombinación homóloga), y de silenciamiento génico transcripcional y post-transcripcional (Bock, 2007). Se han caracterizado varios sitios de inserción del transgén en regiones intergénicas, donde se garantiza su expresión y la misma no afecta la expresión de genes endógenos (Maliga, 2004). Utilizando esta metodología se han logrado plantas transplastómicas capaces de acumular altos niveles de proteínas heterólogas, como por ejemplo: la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis* llegó a representar el 45% de las proteínas solubles totales (PST) de la hoja (De Cosa y col., 2001); el fragmento C de la toxina del tétanos alcanzó el 25% de las PST (Tregoning y col., 2003), y una proteína de un bacteriófago con actividad antibacteriana alcanzó el nivel extremo del 70% de las PST (Oey y col., 2009). Es importante tener en cuenta que las proteínas producidas en cloroplastos no son glicosiladas, lo cual es una limitación si esta modificación es necesaria para su actividad biológica o estabilidad. Si la proteína recombinante no es glicosilada o pudiera cumplir su función en ausencia de glicosilación, la expresión plastídica tendría a favor evitar el agregado de oligosacáridos propios de plantas que pueden resultar inmunogénicos (Gomord y col., 2010). En la mayoría de las especies vegetales el genoma plastídico es de herencia materna, lo cual constituye un punto a favor de la seguridad ambiental, ya que se evita la posibilidad de diseminación del transgén a través del polen. A su vez, a diferencia de las plantas transgénicas nucleares, no se requiere de un proceso importante de selección entre los distintos eventos, ya que en principio se trata de individuos genéticamente idénticos, con el transgén inserto en el mismo lugar en todos ellos (Svab y Maliga, 1993).

Las plantas transplastómicas han sido utilizadas por diferentes grupos de investigación para la expresión de antígenos vacunales contra enfermedades humanas y animales (Daniell, 2006; Chebolu y Daniell, 2007; Fernández-San Millan y col., 2008; Mc Cabe y col., 2008; Zhou y col., 2008).

Según las características de la proteína a ser expresada y en base a la bibliografía existente, se puede sugerir como estrategia para optimizar el rendimiento de la proteína recombinante, acumularla en un compartimiento subcelular específico: citoplasma, retículo endoplasmático, vacuolas, membrana plasmática, apoplasto, y cloroplastos (estroma o lúmen de tilacoides). Para esto se incluyen o eliminan señales de direccionamiento o retención, las cuales pueden ser homólogas o heterólogas (Jarvis, 2008). Sin embargo, cada proteína representa un desafío único y su nivel de acumulación en la célula vegetal no puede predecirse actualmente (Bock y Warzecha, 2010; Rybicki, 2010).

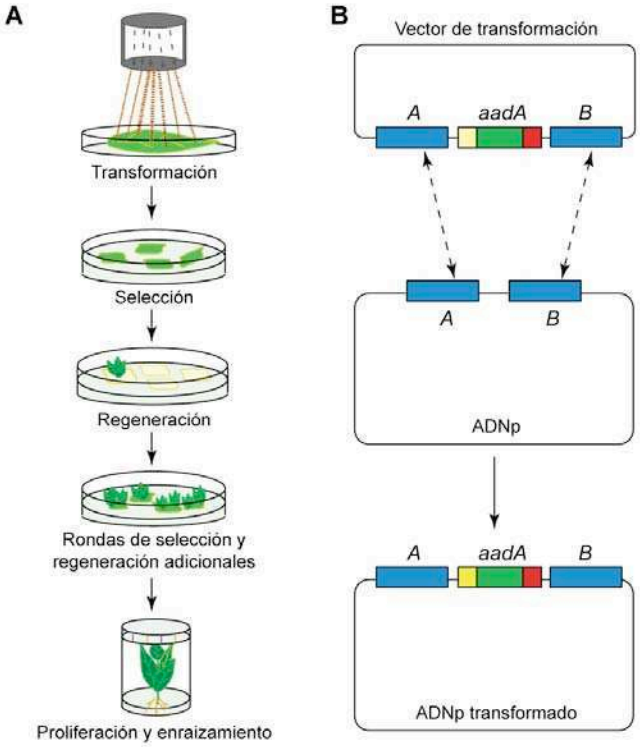

Figura 2. Transformación plastídica mediante recombinación homóloga. A) El vector de transformación se incorpora a las células mediante biobalística. El tejido bombardeado es cortado en pequeños trozos y se incuba en medio de regeneración conteniendo espectinomicina como agente selector. Las células transplastómicas pueden regenerar en presencia del agente selector debido a la presencia del gen de resistencia *aadA*. Los transformantes primarios son generalmente heteroplásticos y se requiere de rondas adicionales de regeneración en presencia de agente selector para eliminar los plastomas *wild-type* residuales. Finalmente, los brotes transplastómicos se incuban en medio libre de fitohormonas para promover el enraizamiento. **B)** Integración del transgén a una región intergénica del genoma plastídico (ADNp). El gen *aadA* es precedido por un promotor plastídico, una secuencia Shine-Dalgarno (amarillo) y una región 3' no traducida plastídica (rojo) para conferirle estabilidad. La integración ocurre por dos eventos de recombinación homóloga en las regiones flanqueantes. El transgén de interés puede ser incorporado, con su propio promotor o combinado con el selector *aadA* formando un operón (adaptado de Bock y Khan, 2004).

En nuestros trabajos previos con plantas transplastómicas podemos encontrar ejemplos de proteínas estables en el estroma del cloroplasto como lo es la proteína β-glucuronidasa: la misma se acumula en niveles de alrededor del 40% de las PST de las hojas de *Nicotiana tabacum* y *Solanum tuberosum* (Segretin, 2009). Como contrapartida, el factor de crecimiento humano (hEGF) es indetectable en condiciones de luz y aumenta su expresión a tan sólo al 0,05% de las PST en condiciones de oscuridad (Wirth y col., 2006). Esto marca claramente la importancia de la estabilidad de la proteína en un determinado compartimiento, cuando se pretende lograr altos niveles de expresión. Existen diferentes estrategias ya probadas en eventos de transformación nuclear, para aumentar los niveles de expresión de una determinada proteína (Streatfield, 2007). Se ha demostrado que los niveles de expresión pueden aumentar considerablemente cuando se dirige la proteína al compartimiento donde esta alcance su correcto plegamiento y permanezca estable. Entre otros, el apoplasto y el

retículo endoplasmático presentan un ambiente oxidante y con baja actividad de proteasas, lo que nos permitió aumentar los niveles de expresión del hEGF (Wirth y col., 2004).

Existen pocos estudios sobre la estabilidad de las proteínas en el ambiente plastídico, y la mayoría de los casos reportados hacen referencia al estroma del cloroplasto. El entorno del lumen del tilacoide presenta importantes diferencias respecto del estroma plastídico, particularmente a nivel de la actividad de proteasas y del potencial redox. Su ambiente oxidante en condiciones de iluminación es fundamental para la formación de puentes disulfuro (Buchanan y Luan, 2005). Es por ello que consideramos importante dirigir la expresión de proteínas recombinantes a este compartimiento, y comparar los niveles de expresión que se pueden alcanzar en él, con los alcanzados en el estroma. Han sido caracterizadas varias señales y vías que permiten atravesar la membrana tilacoidal a proteínas sintetizadas en el citosol (Mori y col., 2001; Jarvis y col., 2004). A su vez, recientemente se publicó un trabajo donde se analiza la estabilidad de una proteína de origen bacteriano, expresada desde el genoma de plástidos de tabaco. En él, los autores muestran que esta proteína es estable en ambos compartimientos, estroma y lumen, y en ambos es posible la formación de puentes disulfuro. Sin embargo, como los propios autores remarcan en el trabajo, solo se analizó la estabilidad de una proteína, la fosfatasa alcalina de *E. coli*, y sería interesante analizar la estabilidad y formación de puentes disulfuros de otras (Bally y col., 2008).

Es también de práctica frecuente optimizar la secuencia del transgén para que se adapte al uso de codones más frecuente de la especie en cuestión. Esta estrategia de importancia en la transformación nuclear tiene poca influencia en los niveles de expresión de genes insertados en el plastoma (Daniell y col., 2009b). La fusión traduccional de la proteína de interés a otra con conocida estabilidad también es utilizada como estrategia para mejorar los niveles de expresión (van Rooijen y Moloney, 1995; Hondred y col., 1999; Patel y col., 2007; Gray y col., 2009a; Muto y col., 2009).

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado plantas transgénicas nucleares y transplastómicas para la producción de moléculas de interés terapéutico (Wirth, 2005; Wirth y col., 2006; Morgenfeld y col., 2009). Asimismo, ha desarrollado el vector pBSW-utr, que permite realizar la transformación plastídica de *N. tabacum* y *S. tuberosum* (Wirth, 2005; Segretin, 2009).

El grupo del Dr. Wigdorovitz, en el Instituto de Virología del INTA-Castelar, ha desarrollado plantas de alfalfa transgénicas que expresan distintos antígenos del virus de la fiebre aftosa (Wigdorovitz y col., 1999; Dus Santos y col., 2002; Dus Santos y col., 2005), rotavirus bovino (RVB) (Mozgovoj y col., 2004a) y virus de la diarrea viral bovina (VDVB). Para los antígenos de aftosa y RVB se demostró su inmunogenicidad y protección en el modelo murino. Es importante mencionar que para todos los casos mencionados los niveles de expresión de los antigenos resultaron subóptimos. Solamente para VDVB se logró obtener un antígeno que una vez procesado demostró inmunogenicidad en cobayos y más importante aún, inmunogenicidad y protección en bovinos (Perez Aguirreburalde y col., 2010).

Asimismo, el grupo del Dr. Andrés Wigdorovitz y el grupo de la Dra. Parreño del Instituto de Virología en colaboración con un grupo del EMBL de Alemania, han desarrollado anticuerpos de simple cadena de llama contra la proteína VP6 de RVB, y contra la proteína E2 del VDVB. Dichos anticuerpos fueron expresados en forma exitosa en *E. coli* y en células de insecto mediante el sistema de baculovirus recombinante (Garaicoechea y col., 2008).

En base a la experiencia de ambos grupos y la necesidad de encontrar una estrategia para optimizar los niveles de expresión, en este trabajo de Tesis se expresaron proteínas de interés para la medicina veterinaria utilizando plantas transplastómicas de tabaco, las cuales permitirían alcanzar mejores niveles expresión y representar una alternativa de bajo costo para la producción de proteínas recombinantes no glicosiladas.

El trabajo ha sido dividido en tres secciones. La primera parte presenta los resultados de la expresión de un antígeno del virus de la fiebre aftosa (VFA), uno de los virus animales más estudiados. Este virus de genoma de ARN de simple cadena infecta el ganado, es muy contagioso y ha causado pérdidas billonarias en el pasado (Grubman y Baxt, 2004). Actualmente sigue siendo un grave problema en Sudamérica, Asia y África. La vacuna utilizada en Argentina es polivalente y a virus inactivado, su producción es costosa y se requiere de un laboratorio de seguridad P3A para la manipulación de virus infecciosos (Brown, 1992).

En la segunda sección se presentan los resultados de la expresión del antígeno VP8*, una proteína no glicosilada de cápside del rotavirus bovino (RVB). Rotavirus es la principal causa de diarrea en terneros (Garaicoechea y col., 2006), y se han desarrollado diversas estrategias de prevención y control basadas en la utilización de vacunas destinadas a estimular la inmunidad pasiva y activa (Matsui y col., 1989; Ruggeri y Greenberg, 1991; Gil y col., 2000; Andrés y col., 2006). Los terneros se infectan a una edad muy temprana, y su principal defensa contra el virus son los anticuerpos transferidos por sus madres durante la lactancia (Fernandez y col., 1998).

Por último, se trabajó con un anticuerpo de cadena simple de camélido (VHH, figura 3) dirigido contra la proteína VP6 de RVB. Los VHHs o nanoanticuerpos son las moléculas más pequeñas con capacidad de unión de alta afinidad, y representan una herramienta valiosa en el diagnóstico, la investigación y terapias de inmunidad pasiva (Harmsen y Haard, 2007). Tienen una mayor estabilidad que otros anticuerpos de simple cadena y gracias a su pequeño tamaño se han diseñado construcciones bivalentes mejorando su funcionalidad (Muyldermans y col., 2009). Poseen dos puentes disulfuro intracatenarios (Wesolowski y col., 2009) y se producen de rutina en *E. coli* y levaduras, obteniéndose en el orden de los miligramos de forma soluble y con la conformación correcta (Frenken y col., 2000; van der Linden y col., 2000). El

establecimiento de una plataforma de expresión en plantas para estas moléculas podría mejorar la relación rendimiento/costo. Para lograr esto, es necesario que los niveles de expresión sean aceptables y la purificación a partir del tejido vegetal no presente complicaciones adicionales.

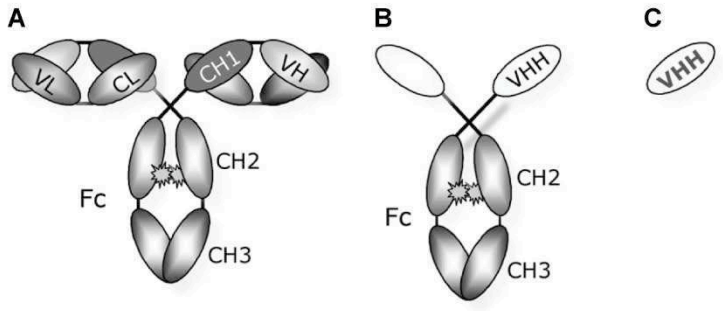

Figura 3. Estructura de un anticuerpo de camélido de simple cadena (VHH). Se representa la estructura de un anticuerpo convencional (A), un anticuerpo de camélido que carece de cadenas livianas (B), y su fragmento N-terminal con capacidad de unión llamado VHH (C) (tomado de Muyldermans y col., 2009).

Objetivo general

Estudiar la factibilidad de utilizar plantas transplastómicas de tabaco como plataforma de expresión de antígenos y anticuerpos a utilizarse en *kits* diagnósticos y/o vacunas a subunidad de uso veterinario.

Objetivos particulares:

Expresar los antígenos VP-βGUS del VFA, VP8* del RVB, y el nanoanticuerpo 3B2 (anti-RVB) en plantas transplastómicas de tabaco.

Comparar el sistema de expresión propuesto con los sistemas empleados anteriormente y evaluar en cada caso las ventajas y desventajas.

Evaluar las estrategias de redireccionamiento subcelular y la fusión a proteínas estables en el estroma del cloroplasto con el fin de incrementar la acumulación de las proteínas recombinantes y optimizar el sistema de expresión.

RESULTADOS

Parte I: Expresión de un epítope de VP1 del virus de la fiebre aftosa fusionado a la enzima β-glucuronidasa (VP-βGUS)

Introducción

La primera proteína expresada en plantas transplastómicas de tabaco en el marco de esta Tesis, fue VP-βGUS. Esta proteína quimérica es una fusión entre el epítope contenido entre los aminoácidos 135 a 160 de la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa, y la enzima bacteriana β-glucuronidasa.

El virus de la fiebre aftosa (VFA) provoca una enfermedad de curso agudo que afecta a animales domésticos biungulados (ganado bovino, porcino, ovino y caprino), y a más de 70 especies de animales salvajes. Se caracteriza por fiebre y la presencia de vesículas principalmente en la cavidad bucal, hocico, espacios interdigitales y pezuñas. La fiebre aftosa es altamente contagiosa y capaz de causar pérdidas billonarias en dólares (Grubman y Baxt, 2004). Esta enfermedad sigue siendo un grave problema en Sudamérica, Asia y África. Argentina es un país libre de fiebre aftosa debido a la implementación de un plan de vacunación, sin embargo existe riesgo de introducción del virus desde los paises vecinos. La vacuna utilizada es polivalente y a virus inactivado; su producción es costosa y se requiere de un laboratorio de seguridad P3A para la manipulación de virus infecciosos (Brown, 2003). El VFA es un miembro de la familia de los picornavirus. Cada virión está compuesto por 60 copias de cada una de las 4 proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4, 2 copias de VP0, y un genoma de ARN de simple cadena positiva al cual se une la proteína VPg en su extremo 5' (La Torre y col., 1980).

La proteína de cápside VP1 contiene un péptido altamente antigénico, que se encuentra expuesto en la superficie del virión e incluye el triplete RGD involucrado en la interacción con integrinas de las células que infecta (Grubman y Baxt, 2004; figura 4).

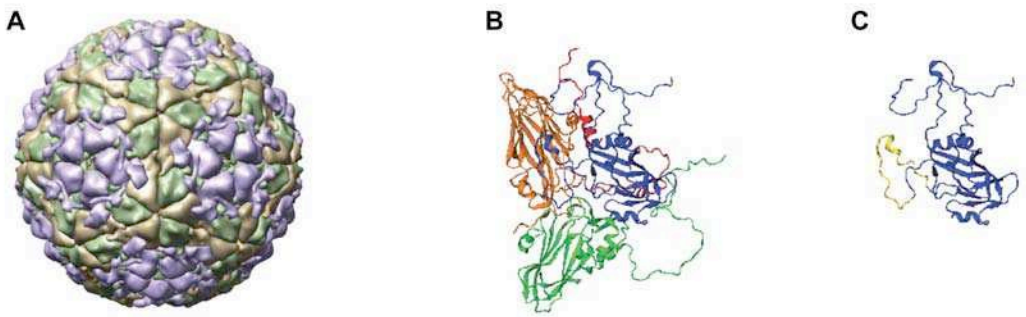

Figura 4. Virus de la fiebre aftosa y epítope p135-160 de VP1. A) Estructura icosaédrica del virión formada por 60 protómeros. **B)** Protómero formado por las proteínas estructurales VP1 (azul), VP2 (naranja), VP3 (verde) y VP4 (rojo). **C)** Detalle en la proteína VP1 del péptido contenido en los aminoácidos 135 a 160 de VP1 (color amarillo) (tomado de Logan y col., 1993).

Este péptido (VP) fue expresado previamente en plantas transgénicas de alfalfa, fusionado a la enzima β-glucuronidasa (βGUS). La construcción VP-βGUS permitió la selección de aquellas líneas transgénicas que presentaban mayores niveles de expresión mediante un ensayo fluorométrico de actividad β-glucuronidasa (Dus Santos y col., 2002). En la línea transgénica con mayor nivel de expresión, la proteína recombinante representaba el 0,1% de las PST. Al comenzar este trabajo, se decidió utilizar esta construcción para obtener plantas transplastómicas, y así poder realizar una comparación directa con las plantas de alfalfa transgénicas obtenidas anteriormente. Entonces, el interés de expresar VP-βGUS en plantas transplastómicas de tabaco se focalizó en realizar una comparación entre los distintos sistemas de expresión en cuanto a los niveles y a la funcionalidad de la proteína expresada, y no en desarrollar una vacuna a subunidad.

Resultados

Subclonado de la secuencia de VP-βGUS al vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr.

Se obtuvo la secuencia de VP-βGUS a partir del plásmido pBI221 VP-βGUS (Dus Santos y col., 2002). Esta secuencia fue subclonada en el vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr (Wirth y col., 2006), obteniéndose así la construcción pBSW-utr/VP-βGUS (figura 5). Para esto, se amplificó la secuencia de VP-βGUS a partir de la construcción pBI221 VP-βGUS mediante PCR, utilizando la enzima *Pfu* y los oligonucleótidos iniciadores NDE5'P1 y GUS3' que agregaron los sitios de restricción para las enzimas NdeI y XbaI. El producto de PCR con extremos romos fue ligado al vector pZErO-2 (Invitrogen), previamente cortado con la enzima EcoRV. El plásmido obtenido, pZErO-2/VP-βGUS, fue secuenciado para descartar mutaciones introducidas por la reacción de PCR. Esta construcción intermediaria (pZErO-2/VP-βGUS) fue cortada con las enzimas NdeI y XbaI y el fragmento VP-βGUS fue ligado al vector pBSW-utr, obtenido a partir de la construcción pBSW-utr/hEGF (Wirth y col., 2006), que había sido previamente cortado con las mismas enzimas para remover la secuencia de hEGF.

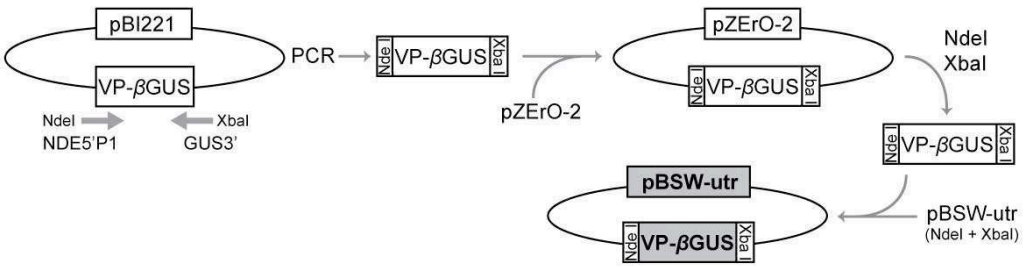

Figura 5. Subclonado de la secuencia de VP-βGUS al vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr. Se indican en el esquema los pasos seguidos para la obtención de la construcción pBSW-utr/VP-βGUS.

Previamente a realizar la transformación de las plantas de tabaco, se confirmó la integridad de la construcción mediante mapeo de restricción. Los fragmentos de restricción obtenidos luego de cortar con las enzimas NdeI y XbaI mostraron bandas del tamaño esperado: una banda de 1,8 kb para pBSW-utr/βGUS y una de 1,9 kb para pBSW-utr/VP-βGUS (figura 6A). Los clones recombinantes fueron confirmados mediante una reacción de PCR. Esta reacción de PCR solo permite la amplificación de un fragmento de 1,9 kb cuando se utiliza como molde ADN de las construcciones pBI221 VP-βGUS y pBSW-utr/VP-βGUS. Como control negativo se utilizó ADN del plásmido pBSW-utr/βGUS (figura 6B). Luego los clones recombinantes fueron caracterizados mediante un ensayo de actividad de la enzima β-glucuronidasa; la fusión VP-βGUS mostró actividad de la enzima comparable a la obtenida con la construcción pBSW-utr/βGUS, utilizada como control positivo (figura 6C). Finalmente, extractos proteicos de los clones recombinantes fueron analizados en un ensayo de *western blot* utilizando un suero de ratón contra el epítope VP formado por los aminoácidos 135-160 de VP1 del VFA. Como control positivo de la inmunodetección se sembraron distintas cantidades de VFA purificado. Las muestras de VFA se sembraron 1 hora después de empezada la corrida electroforética para poder visualizar en el mismo gel la proteína VP1 (figura 6D).

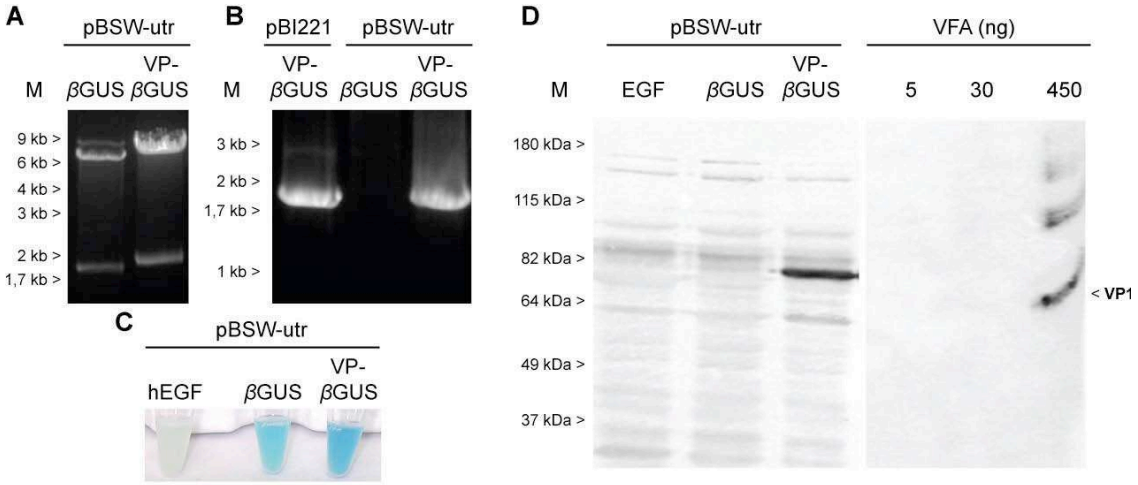

Figura 6. Análisis de la integridad y funcionalidad de la construcción pBSW-utr/VP-βGUS en *E. coli*. A) Mapeo de restricción con las enzimas NdeI y XbaI (gel de agarosa 1% [m/v], tinción con bromuro de etidio). **B)** PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores NDE5'P1 y GUS3'. Como control negativo se utilizó ADN del plásmido pBSW-utr/βGUS. M: 1 kb Plus *DNA ladder* (Invitrogen). **C)** Ensayo de actividad β-glucuronidasa. Se incluyeron las construcciones pBSW-utr/βGUS y pBSW-utr/hEGF como control positivo y negativo, respectivamente. **D)** Extractos de proteínas totales de *E. coli* analizadas mediante *western blot* (gel de poliacrilamida 8% [m/v]) utilizando un suero de ratón contra el epítope contenido en los aminoácidos 135-160 de VP1 del VFA. Como control positivo se sembraron distintas cantidades de VFA purificado; M: marcadores de peso molecular, *Benchmark* (Invitrogen).

Obtención y caracterización molecular de plantas transplastómicas VP-βGUS.

Se realizó la transformación de cloroplastos de tabaco utilizando la técnica de biobalística. Se bombardearon hojas de *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana con micropartículas de oro recubiertas con el vector pBSW-utr/VP-βGUS. Posteriormente, trozos de las hojas bombardeadas y controles sin bombardear se regeneraron en medio RMOP, en presencia de 500 mg/L del agente selector (espectinomicina) o sin selección en los controles de regeneración. Al cabo de aproximadamente un mes se obtuvieron los primeros brotes, a partir de los cuales se extrajeron trozos de hojas que fueron utilizados como explantos en sucesivas rondas de regeneración con el objetivo de alcanzar la homoplastía. En la figura 7 se pueden observar los resultados de un experimento de transformación y los controles mencionados. Las plantas obtenidas se caracterizaron inicialmente mediante ensayos de PCR y actividad β-glucuronidasa. En la figura 8A se esquematiza la región del genoma plastídico donde ocurre la integración por recombinación homologa y el genoma modificado. Se muestran también los sitios de hibridación de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR.

Figura 7. Experimento de transformación de cloroplastos de tabaco por biobalística. Se puede observar un resultado típico de un experimento de transformación. Las fotos fueron tomadas 30 días después del bombardeo. Sp: espectinomicina (500 mg/L).

En la figura 8B y C se muestran los resultados obtenidos al analizar 4 líneas transplastómicas independientes mediante PCR y ensayo de actividad β-glucuronidasa. Las distintas líneas transplastómicas fueron regeneradas en presencia de agente selector y luego de tres rondas de regeneración las plantas fueron rusticadas. Las plantas desarrollaron normalmente (figura 9), siendo indistinguibles de plantas de tabaco *wild-type* o transplastómicas βGUS obtenidas previamente en el laboratorio (Wirth, 2005). Las semillas obtenidas de plantas autofecundadas fueron capaces de germinar en presencia de espectinomicina, confirmándose así la transmisión del transgén (figura 10).

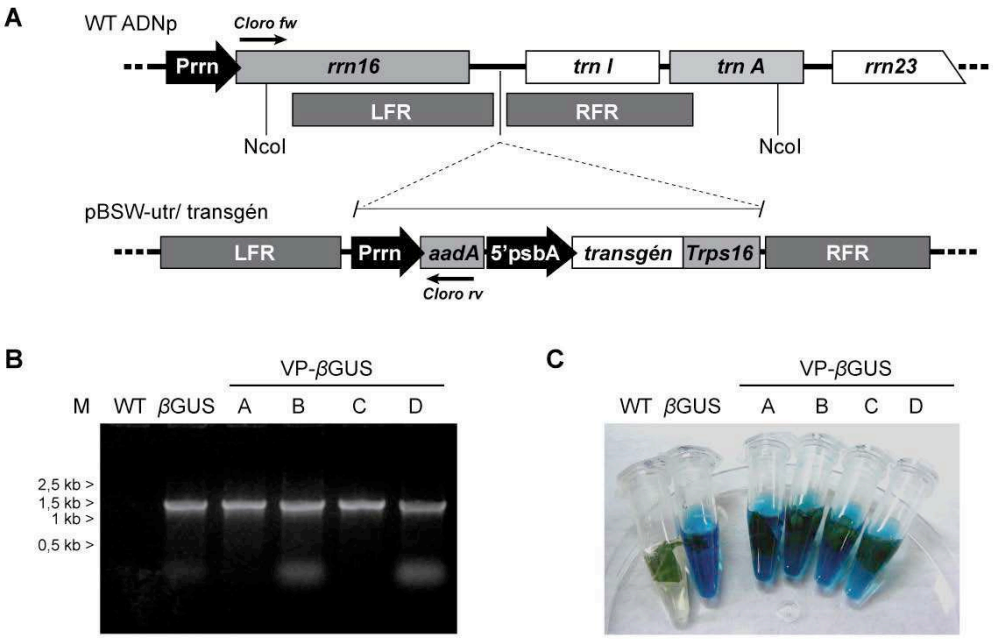

Figura 8. Identificación de líneas transplastómicas VP-*β*GUS por PCR y actividad *β*-glucuronidasa. **A)** Esquema del sitio de integración en el genoma plastídico (WT ADNp) y los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la PCR: *Cloro fw* y *Cloro rv*. **B)** PCR con oligonucleótidos iniciadores *Cloro fw* y *Cloro rv* que permiten amplificar un fragmento de 1.450 pb sólo en las plantas transplastómicas (gel de agarosa 1% [m/v], tinción con bromuro de etidio). Se confirmó la naturaleza transplastómica en 4 líneas VP-*β*GUS independientes (A, B, C y D). M: 1 kb *DNA Ladder* (Promega). **C)** Ensayo histoquímico de actividad *β*-glucuronidasa. *β*GUS: transplastómica control positivo; WT: planta de tabaco *wild-type*.

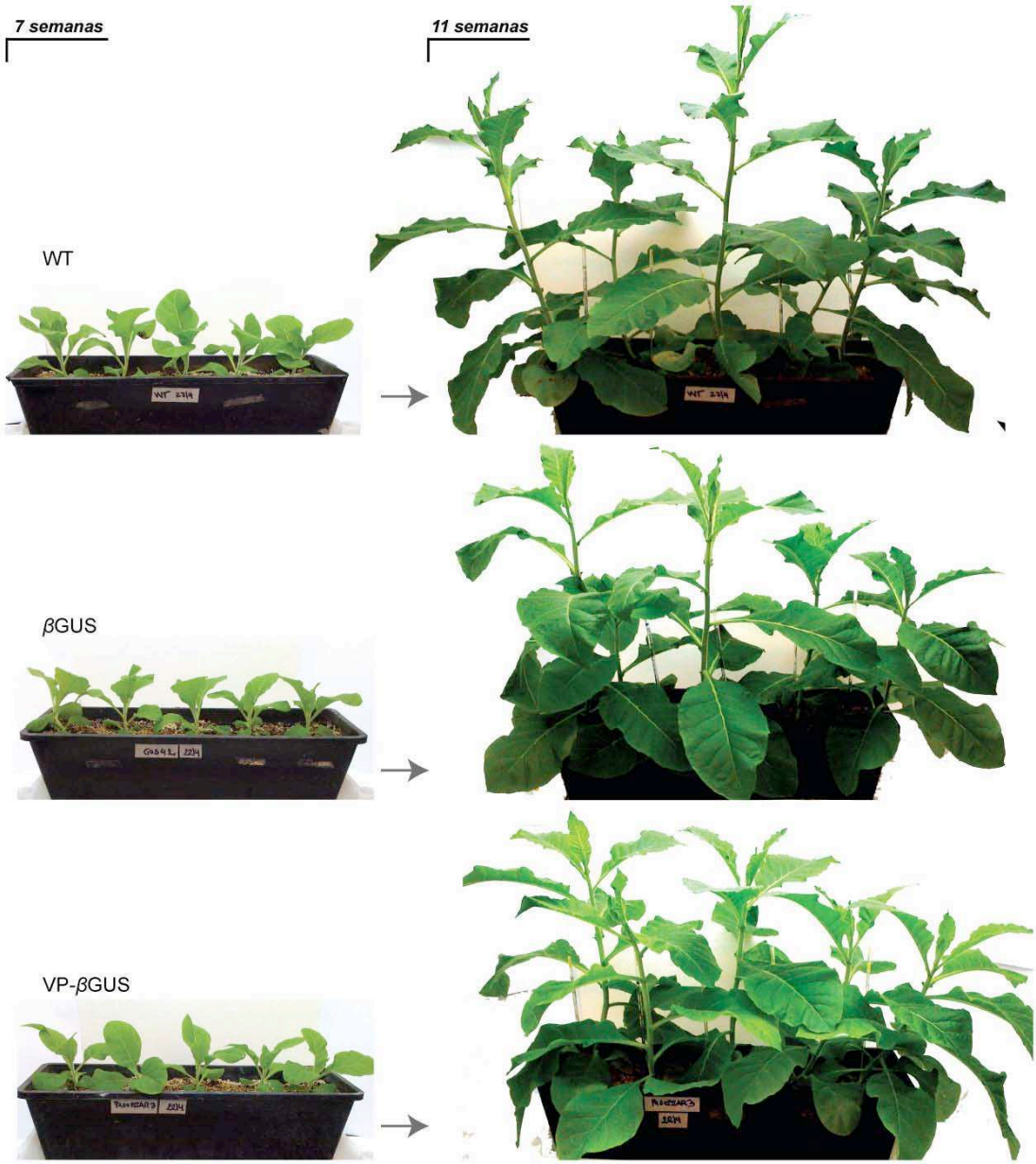

Figura 9. Fenotipo de las plantas transplastómicas VP-*β*GUS. Semillas de plantas de tabaco *wild-type* y transplastómicas *β*GUS y VP-*β*GUS (estas últimas en presencia de 500 mg/L de espectinomicina), fueron germinadas en medio MS. Las plantas crecieron *in vitro* hasta el desarrollo de raíces, y luego fueron rusticadas. Las fotos fueron tomadas a las 7 y 11 semanas luego de la germinación.

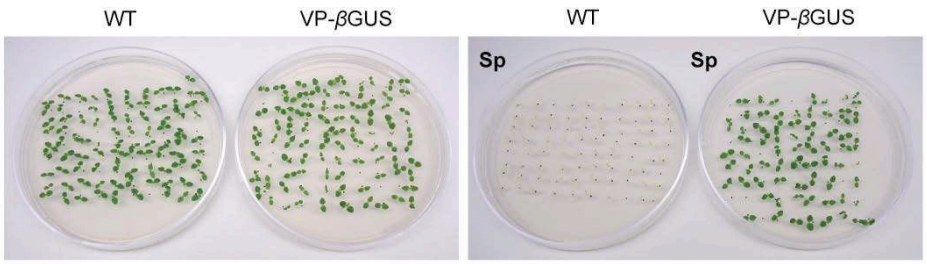

Figura 10. Transmisión del transgén en las semillas de plantas transplastómicas VP-*β*GUS. Se germinaron en medio MS semillas de plantas de tabaco *wild-type* y transplastómicas VP-*β*GUS en ausencia o presencia del agente selector. Sp: espectinomicina (500 mg/L).

Estas plantas fueron caracterizadas a nivel molecular y posteriormente utilizadas en los ensayos de inmunización. Se confirmó la inserción del transgén por recombinación homóloga en el genoma plastídico y se estudió la homoplastía por *Southern blot* (figura 11). Se observó una mínima presencia de la banda correspondiente al genoma *wild-type* en todas las plantas transplastómicas, lo cual indicaría un estado heteroplástico o bien la presencia de fragmentos de ADN plastídico en el genoma nuclear (Hager y col., 1999; Ruf y col., 2000).

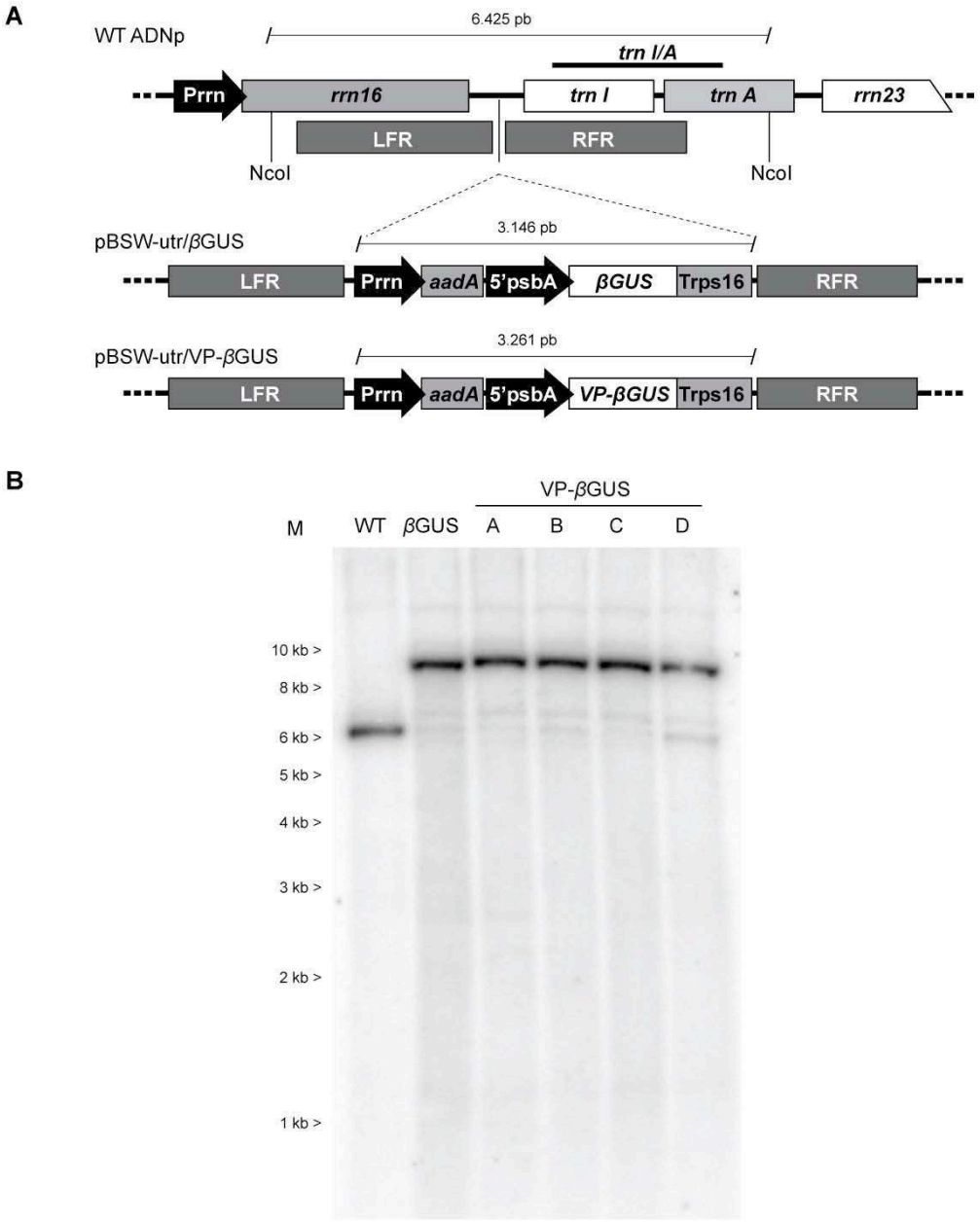

Figura 11. Análisis por *Southern blot* de plantas transplastómicas VP-βGUS. A) Esquema de la zona de integración del transgén en el genoma plastídico (WT ADNp). Se indica la posición de los sitios NcoI y la zona donde hibrida la sonda *trn I/A* utilizada en el *Southern blot*. **B)** *Southern blot* (gel de agarosa 0,8% [m/v]) revelado con la sonda dirigida contra los genes plastídicos *trn I* y *trn A*. βGUS: transplastómica utilizada como control positivo; M: 1 kb *DNA Ladder* (PB-L).

Mediante un ensayo de *northern blot* se detectaron los ARN mensajeros conteniendo el transgén, los cuales mostraron los tamaños esperados, observándose una mayor abundancia del transcripto monocistrónico que se produce a partir del promotor inducible por luz del gen *psbA* (figura 12). Se confirmó la expresión de la proteína recombinante por SDS-PAGE y *western blot* (figura 13). VP-βGUS resultó ser la proteína mayoritaria en el extracto proteico de las hojas de plantas transplastómicas, claramente más abundante que la subunidad mayor de RuBisCO.

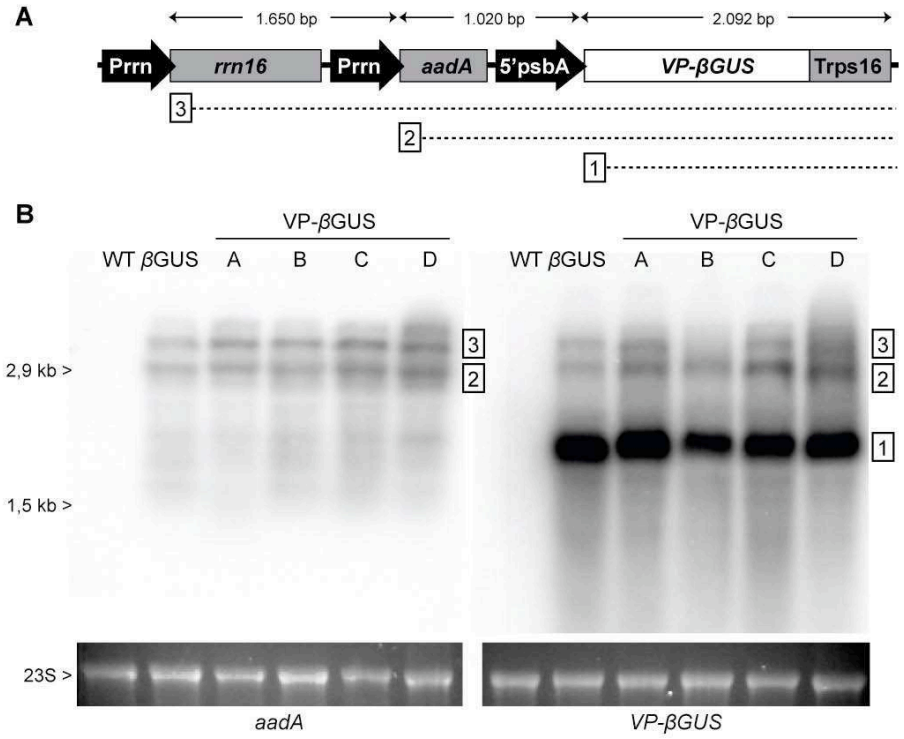

Figura 12. Análisis por *northern blot* de *las* plantas transplastómicas VP-βGUS. A) Esquema del transgén donde se indican los transcriptos policistrónicos (2 y 3) y el transcripto monocistrónico (1) esperados. **B)** *Northern blot* (gel desnaturalizante de agarosa 1,5% [m/v]) revelado con una sonda contra el gen selector *aadA* (izquierda) y el transgén *VP-βGUS* (derecha). Se indican las posiciones de los ARN ribosomales 23S (2,9 kb) y 16S (1,5 kb) como referencia de tamaño. En la parte inferior de la figura se muestran las bandas correspondientes al ARN 23S en el gel de agarosa, previo a la transferencia, como control de carga. Los transcriptos esperados de acuerdo al esquema presentado en "A" se señalan con números 1, 2 y 3. βGUS: transplastómica control.

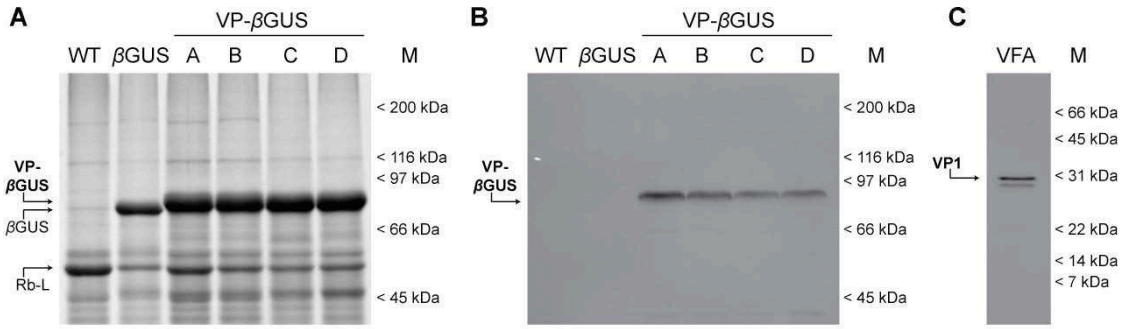

Figura 13. Análisis por SDS-PAGE y *western blot* de plantas transplastómicas VP-*β*GUS. A) SDS-PAGE (8% [m/v]) teñido con *Coomasie Brilliant Blue* de extractos proteicos totales de hojas. En cada calle se sembraron proteínas totales de hojas obtenidas a partir de 2 mg de tejido fresco. **B)** *Western blot* (gel de poliacrilamida 8% [m/v]) utilizando un suero de ratón contra el epítope contenido en los aminoácidos 135-160 de VP1 del virus de la fiebre aftosa (VFA). **C)** Control positivo de la inmunodetección: 1 μg de VFA purificado fue corrido en un gel de poliacrilamida 15% (m/v) y luego transferido y revelado como se indica en "B". *β*GUS: transplastómica control; Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO; M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD).

Comparación de la expresión entre plantas transgénicas nucleares y transplastómicas.

Con el fin de comparar los niveles de expresión de la enzima *β*-glucuronidasa en las plantas transgénicas nucleares VP-*β*GUS de alfalfa (Dus Santos y col., 2002), transgénicas nucleares *β*GUS de tabaco y transplastómicas *β*GUS y VP-*β*GUS, se realizaron ensayos fluorométricos para medir la actividad de la enzima (figura 14). Se observó una diferencia de 4 órdenes de magnitud en favor de las plantas transplastómicas respecto de las transgénicas nucleares, ya fueran estas de tabaco o alfalfa.

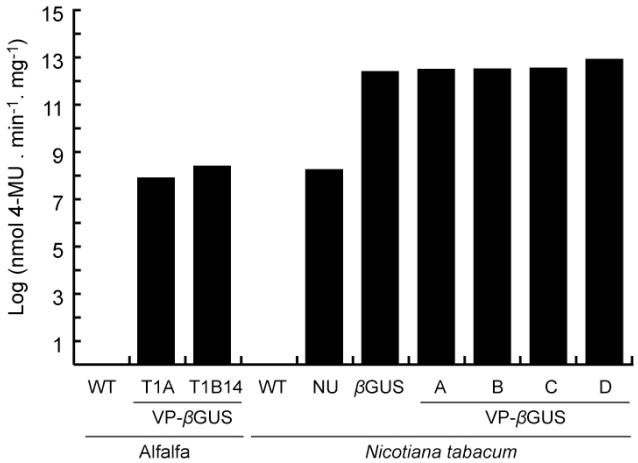

Figura 14. Comparación de la expresión entre plantas transgénicas nucleares y transplastómicas mediante un ensayo cuantitativo de actividad *β*-glucuronidasa. Se determinó la actividad enzimática en extractos de hojas de plantas de alfalfa transgénicas nucleares, plantas de tabaco transgénicas nucleares y transplastómicas mediante un ensayo fluorométrico. T1A: promotor CaMV35S (Dus Santos y col., 2002); T1B14: promotor CVMV (*Cassava Vein Mosaic Virus*); NU: transgénica nuclear para el gen *uidA*; *β*GUS: transplastómica para el gen *uidA*; WT: genotipo *wild-type*.

Cuantificación de los niveles de expresión.

Las primeras determinaciones de la acumulación de proteína recombinante en las hojas de las plantas VP-βGUS habían mostrado una importante variabilidad, probablemente debida a diferencias en las condiciones fisiológicas de las distintas hojas analizadas (resultados no mostrados). En base a esto, se procedió a estudiar la acumulación de la proteína recombinante en las distintas hojas de una misma planta. Para ello se determinaron las proteínas solubles totales por el método de Bradford (1976), y se sembraron en geles SDS-PAGE entre 2 y 20 μg de los extractos proteicos; en el mismo gel se sembraron distintas cantidades de albúmina sérica bovina (BSA), como estándar de masa. Los geles de poliacrilamida fueron teñidos con *Coomasie Brilliant Blue* y las bandas correspondientes a VP-βGUS y BSA fueron analizadas por densitometría con el programa Image J (NIH, http://rsbweb.nih.gov/ij).

Un ensayo preliminar confirmó la variabilidad observada anteriormente, ya que se podían detectar valores de expresión de VP-βGUS menores al 5% de las PST en la hoja joven y de hasta el 66% de las PST en la hoja senescente (≈3 mg de VP-βGUS/g TF) (figura 15). Se repitió el estudio analizando una planta con un mayor número de hojas, que se encontraba en estadío de floración (figuras 16 y 17). Se volvió a observar una variación importante en función de la hoja analizada, con valores de expresión para la proteína VP-βGUS menores al 10% de las PST en las hojas jóvenes, del 50% de las PST en las maduras, y alcanzando el 70% de las PST en las hojas senescentes. La mayor acumulación de la proteína recombinante en las hojas senescentes se vió acompañada por una disminución de las proteínas endógenas de la planta. Esto muestra la gran estabilidad de la proteína de fusión en el tejido foliar, lo que permite que la proteína se acumule a medida que las hojas desarrollan, superando en algún momento los niveles de la subunidad mayor de RuBisCO, y manteniéndose aún en aquellas hojas senescentes donde las proteínas propias de la planta comienzan a ser degradadas para redirigir nutrientes hacia otros órganos (flores y semillas). En las hojas maduras intermedias se registró el mayor rendimiento de proteína heteróloga por masa de tejido fresco, alcanzando valores cercanos a 10 mg de VP-βGUS /g TF. Se repitió la cuantificación para una hoja madura (hoja 9 en figura 16), esta vez mediante la técnica de *western blot* y utilizando como estándar VFA purificado (figura 18). Esta nueva determinación arrojó un valor de 51% de las PST, levemente inferior al obtenido por el método anteriormente descripto (60% de las PST). Esto podría ser atribuido a la diferencia que existe en los pesos moleculares de VP-βGUS y VP1 de VFA (72,5 y la 28 kDa, respectivamente), entonces dado su mayor tamaño VP-βGUS podría tener una menor eficiencia en la transferencia lo que llevaría a una subestimación en la determinación por este método.

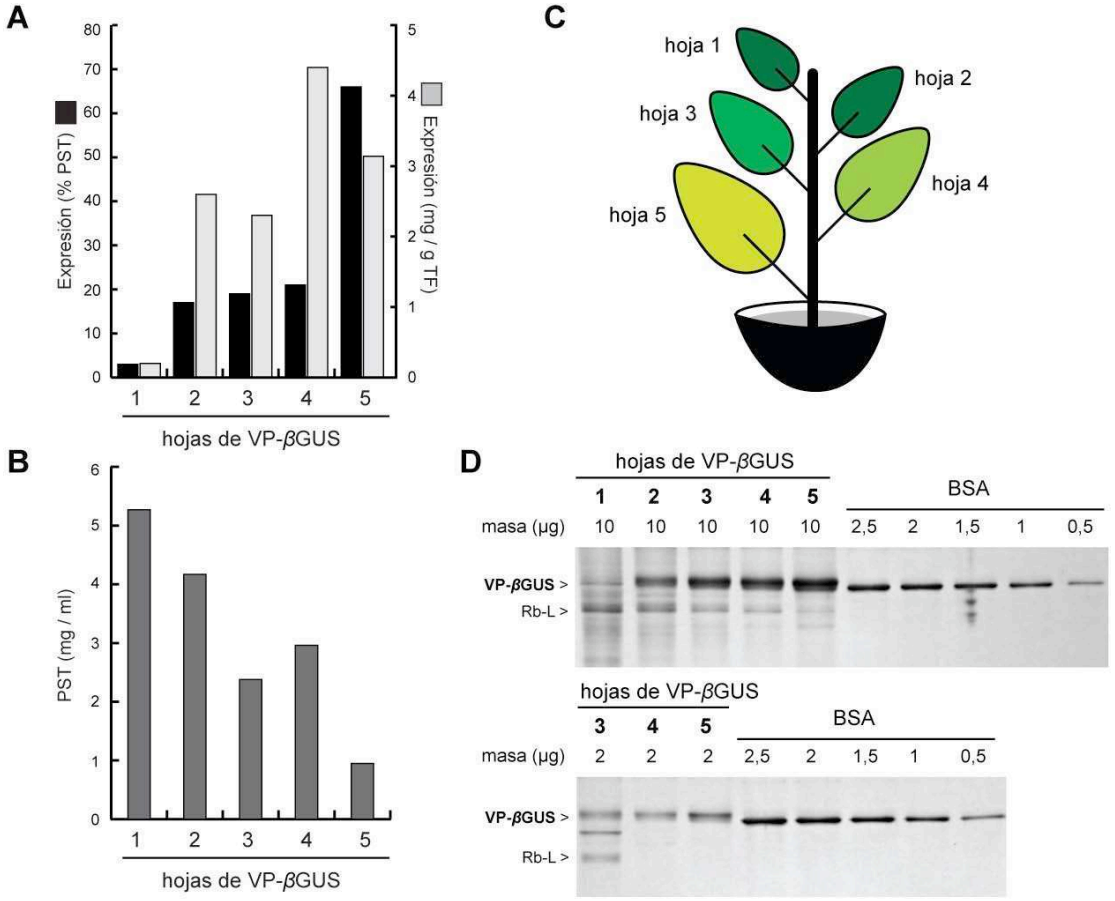

Figura 15. Cuantificación preliminar de los niveles de expresión de una planta VP-*β*GUS mediante SDS-PAGE. A) Determinación de la acumulación de VP-*β*GUS en las distintas hojas de una planta transplastómica, por densitometría en geles de poliacrilamida, utilizando el programa Image J (NIH, http://rsbweb.nih.gov/ij). El resultado se expresa como la masa de la proteína recombinante respecto de la masa de las proteínas solubles totales en el extracto (% PST), y como miligramo de proteína recombinante obtenida por gramo de tejido fresco (mg/g TF). **B)** Determinación de proteínas solubles totales (PST) por el método de Bradford en los extractos utilizados para la cuantificación presentada en "A". **C)** Esquema de la planta empleada en el estudio, en donde se representa la hoja senescente con color verde claro (hoja 5). **D)** Geles utilizados para la cuantificación presentada en "A". SDS-PAGE (10% [m/v]), tinción con *Coomasie Brilliant Blue*. Sólo se tuvieron en cuenta para las determinaciones aquellas calles en las cuales la señal de VP-*β*GUS se encontraba dentro de la curva de calibración realizada con BSA. Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO; BSA: albúmina sérica bovina.

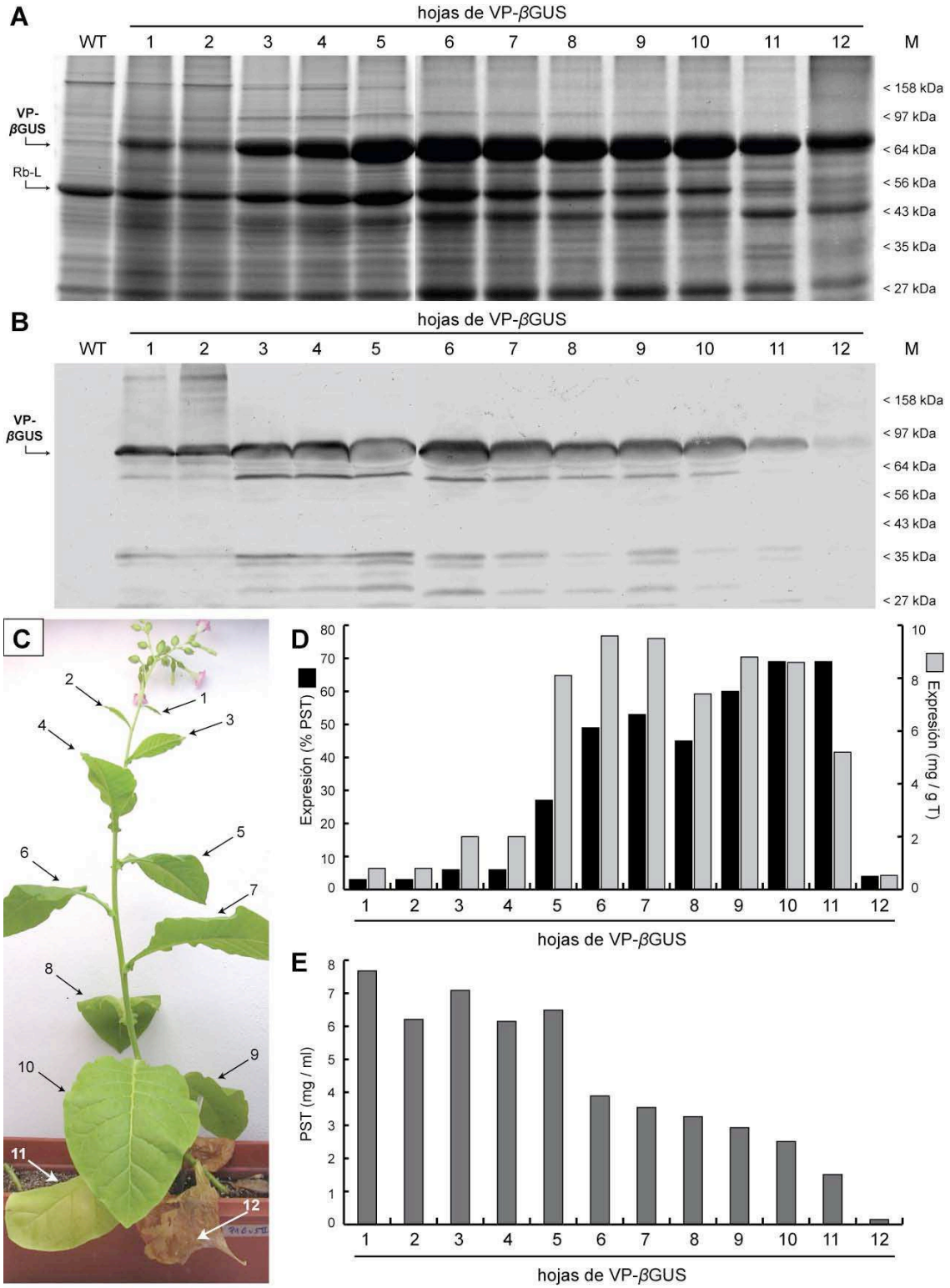

Figura 16. Cuantificación de los niveles de expresión en una planta VP-βGUS mediante SDS-PAGE. A) Análisis cualitativo por SDS-PAGE (10% [m/v]) de extractos totales de distintas hojas de una planta transplastómica VP-βGUS (tinción con *Coomasie brilliant blue*). En cada calle se sembraron proteínas totales obtenidas a partir de 4 mg de tejido fresco (o 0,5 mg de tejido seco para la hoja 12). Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO. **B)** *Western blot* (gel de poliacrilamida 10% [m/v]) utilizando un suero de ratón contra el epítope contenido en los aminoácidos 135-160 de VP1 del virus de la fiebre aftosa. El gel fue sembrado del mismo modo que en "A". M: marcadores de peso molecular, *Protein Ladder* (New England Biolabs). **C)** Planta utilizada en el estudio. **D)** Determinación de la acumulación de VP-βGUS en

las distintas hojas de la planta transplastómica por densitometría de geles de poliacrilamida, utilizando el programa Image J (NIH, http://rsbweb.nih.gov/ij). El resultado se expresa como masa de proteína recombinante respecto de la masa de las proteínas solubles totales en el extracto (% PST), y como miligramo de proteína recombinante obtenida por gramo de tejido fresco o seco (para la hoja 12) (mg/g T). **E)** Determinación de proteínas solubles totales (PST) por el método de Bradford en los extractos utilizados para la cuantificación presentada en "D".

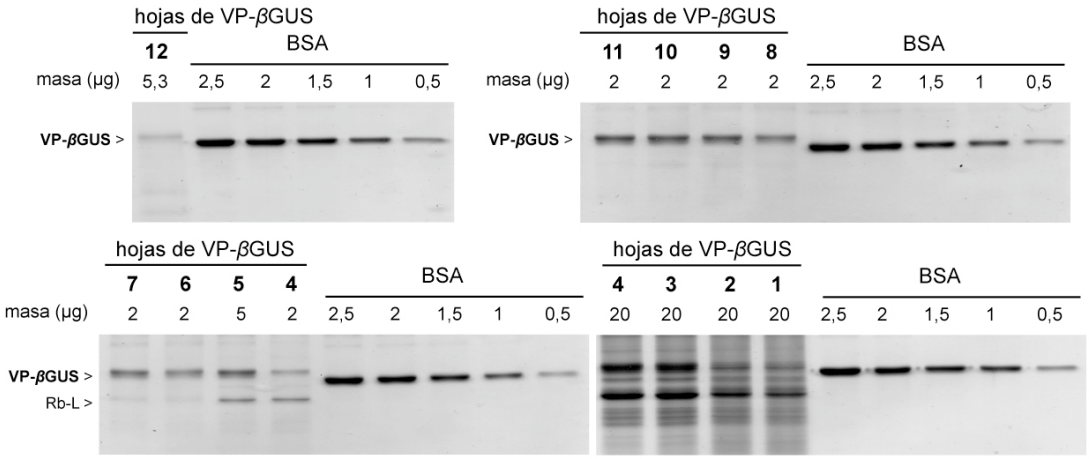

Figura 17. Cuantificación de los niveles de expresión en una planta VP-*β*GUS mediante SDS-PAGE (continuación). Geles utilizados para la cuantificación presentada en la figura 16D. SDS-PAGE (10% [m/v]), tinción con *Coomasie Brilliant Blue*. Sólo se tuvieron en cuenta para las determinaciones aquellas calles en las cuales la señal de VP-*β*GUS se encontraba dentro de la curva de calibración realizada con BSA. Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO; BSA: albúmina sérica bovina.

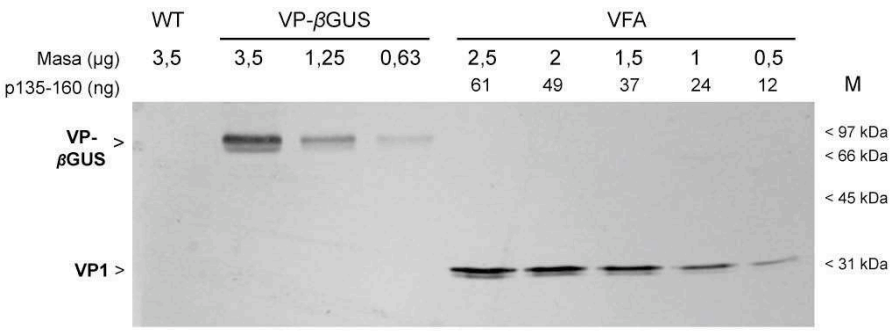

Figura 18. Cuantificación de los niveles de expresión de VP-*β*GUS por *western blot*.

Se utilizó la hoja 9 de la planta transplastómica VP-*β*GUS mostrada en la figura 16C. El *western blot* (gel de poliacrilamida 15% [m/v]) fue revelado con un suero de ratón contra el epítope contenido en los aminoácidos 135-160 de VP1 del virus de la fiebre aftosa (VFA). Se indica la masa de virus purificado sembrada por calle (utilizada como curva de calibración), y la correspondiente al péptido p135-160. M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD).

Inmunogenicidad de la proteína recombinante VP-βGUS.

Se confirmó la inmunogenicidad de la proteína recombinante producida en las plantas transplastómicas VP-βGUS utilizando el modelo murino. Estos estudios fueron realizados por la Dra. Marina Mozgovoj (CICV y A, Instituto de Virología. INTA-Castelar). Se realizó un ensayo preliminar, utilizando un número reducido de animales, los cuales se inocularon con extractos de hojas de plantas transplastómicas VP-βGUS y βGUS. Los ratones fueron inoculados con 31 μg de proteínas totales de plantas transplastómicas VP-βGUS y βGUS, siendo este segundo grupo el control negativo del ensayo. Se repitió la inoculación a los 21 días, y a los 30 días se obtuvo una muestra de sangre para analizar la presencia de anticuerpos específicos, que reconocieran en un ELISA el epítope p135-160 de VP1 de VFA. Los resultados se muestran en la figura 19. Se observaron niveles variables de anticuerpos específicos en los sueros de los animales inoculados con VP-βGUS.

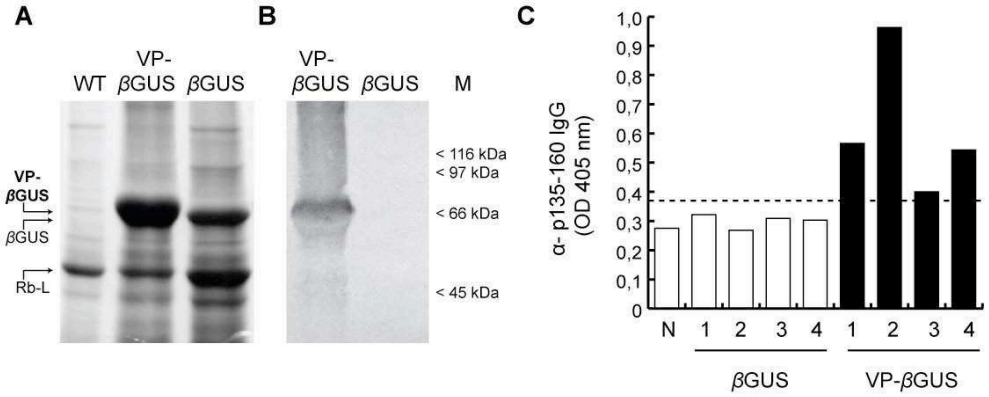

Figura 19. Ensayo preliminar de inmunización con extractos de plantas transplastómicas VP-βGUS. A) Análisis de los extractos proteicos utilizados en la inmunización por SDS-PAGE (8% [m/v]), teñido con *Coomasie Brilliant Blue*. Se sembraron 10 y 24 μg de proteínas totales de extracto de plantas *wild-type* (WT) y transplastómicas, respectivamente. Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO. **B)** *Western blot* (gel de poliacrilamida 8% [m/v]) utilizando un suero de ratón contra el epítope contenido en los aminoácidos 135-160 de VP1 del virus de la fiebre aftosa (VFA). M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD). **C)** Detección de anticuerpos contra el epítope p135-160 de VP1 de VFA por ELISA. Los sueros de los ratones inoculados con extractos de las plantas VP-βGUS y βGUS (control negativo) fueron analizados a los 30 días de la primera inoculación. Los números debajo de las barras identifican a cada ratón, y los valores corresponden a la absorbancia a 405 nm obtenida al utilizar diluciones 1/10 de los sueros en solución de bloqueo. La línea punteada horizontal indica la absorbancia promedio más 3 desviaciones estándar de los sueros obtenidos de animales inmunizados con extracto de planta βGUS. N: suero normal de ratón.

Para realizar un nuevo ensayo con un mayor número de animales, se volvieron a preparar extractos proteicos de hojas, los cuales fueron cuantificados. La cuantificación de estos nuevos extractos mostró que la proteína VP-βGUS correspondía al 74% de las proteínas solubles totales. Los ratones fueron inoculados dos veces (días 0 y 30) con 67 μg de proteínas totales de plantas transplastómicas VP-βGUS y *wild-type* como control negativo. Sus correspondientes sueros fueron analizados a los 45 días de la primera inoculación (figura 20). Se obtuvieron resultados similares: niveles variables de anticuerpos contra VP1 en los distintos sueros de ratones inmunizados con VP-βGUS.

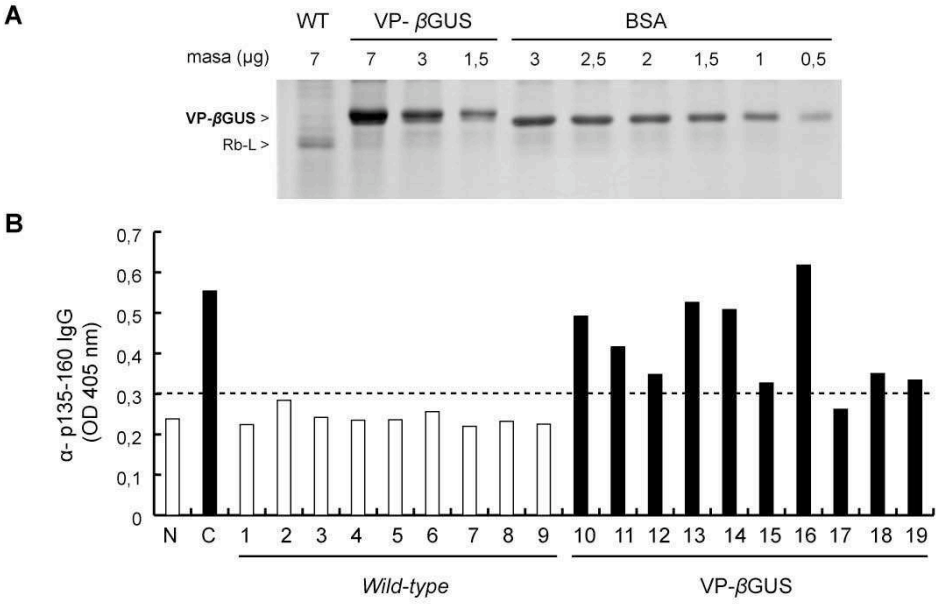

Figura 20. Inmunización con extractos de plantas transplastómicas VP-βGUS. A) Cuantificación mediante densitometría de VP-βGUS en el extracto proteico de la planta transplastómica utilizada para la inmunización. Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO; BSA: albúmina sérica bovina. **B)** ELISA para la detección de anticuerpos en los sueros de los ratones inmunizados. Los sueros fueron analizados a los 45 días de la primera inoculación. Los números debajo de las barras identifican a cada ratón, y los valores se expresan como la absorbancia a 405 nm obtenida al utilizar diluciones 1/10 de los sueros en solución de bloqueo. La línea punteada horizontal indica la absorbancia promedio más 3 desviaciones estándar de los sueros obtenidos de animales inmunizados con extracto de planta *wild-type*. N: suero normal de ratón. C: ratón inmunizado con una vacuna anti-aftosa comercial, utilizado como control positivo.

La presencia de anticuerpos específicos en los sueros fue analizada también mediante *western blot*, lo que permitió confirmar la reactividad de los mismos contra VP-βGUS y βGUS producidas en *E. coli* y contra el VFA (figura 21).

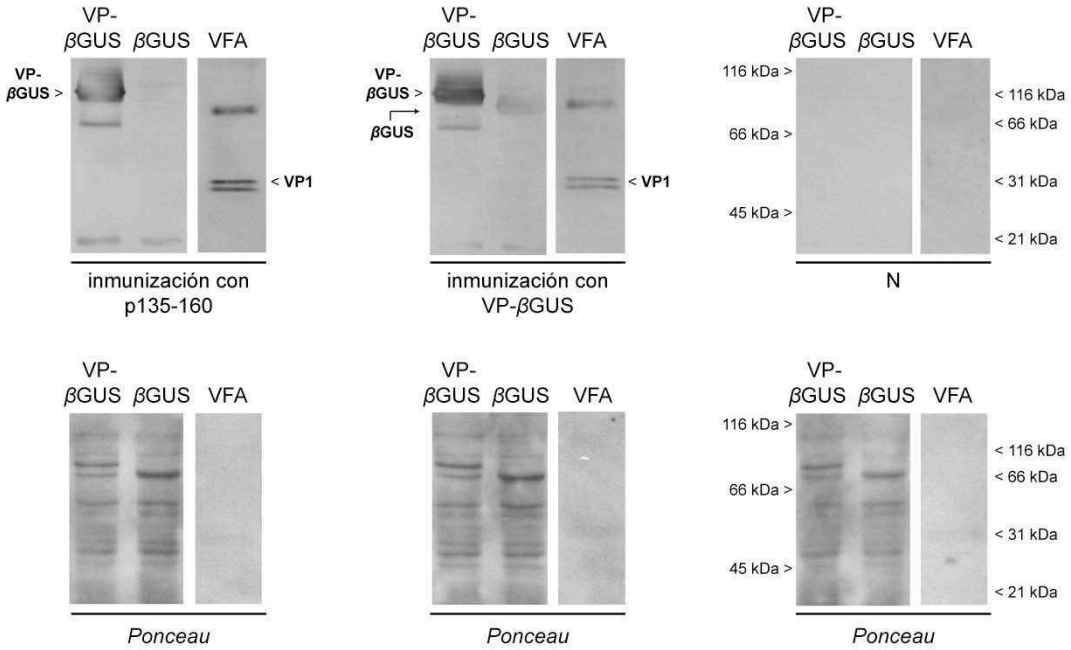

Figura 21. Análisis de los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con extracto de plantas transplastómicas VP-βGUS. Análisis por *western blot,* de un *pool* de sueros de ratones inmunizados con extractos de plantas VP-βGUS, para confirmar la reactividad de los mismos contra VP-βGUS y βGUS producidas en *E. coli* (gel de poliacrilamida 10% [m/v]), y contra el VFA (gel de poliacrilamida 15% [m/v]). Se utilizó un suero de ratón inmunizado con el péptido p135-160 de VP1 de VFA y un suero normal de ratón (N) como control positivo y negativo, respectivamente. Se muestra la tinción con rojo *Ponceau* de las membranas previamente a la inmunodetección, como control de carga de proteínas totales.

Parte II: Expresión del antígeno VP8* de rotavirus bovino.

Introducción

La segunda proteína expresada en plantas transplastómicas de tabaco fue el antígeno VP8* de rotavirus bovino. Esta proteína no glicosilada surge del clivaje por tripsina de VP4, la cual está dimerizada y expuesta en la superficie del virión formando las espículas características de los rotavirus (figura 22). VP8* fue expresada por la Dra. Marina Mozgovoj (Instituto de Virología, CICV y A. INTA-Castelar) en plantas de alfalfa transgénicas y mediante expresión transitoria utilizando un vector viral derivado del TMV en *Nicotiana benthamiana* (Mozgovoj, 2008). VP8* se acumuló en bajos niveles en las plantas de alfalfa transgénicas (0,006 μg/g hoja fresca), y la inmunidad conferida no permitió la protección contra el virus infectivo en el modelo del ratón lactante. Mediante el vector viral se mejoraron los niveles de expresión, obteniéndose 5 μg de VP8* purificada por gramo de hoja fresca, la cual fue inmunogénica y protectiva (Mozgovoj y col., 2004b).

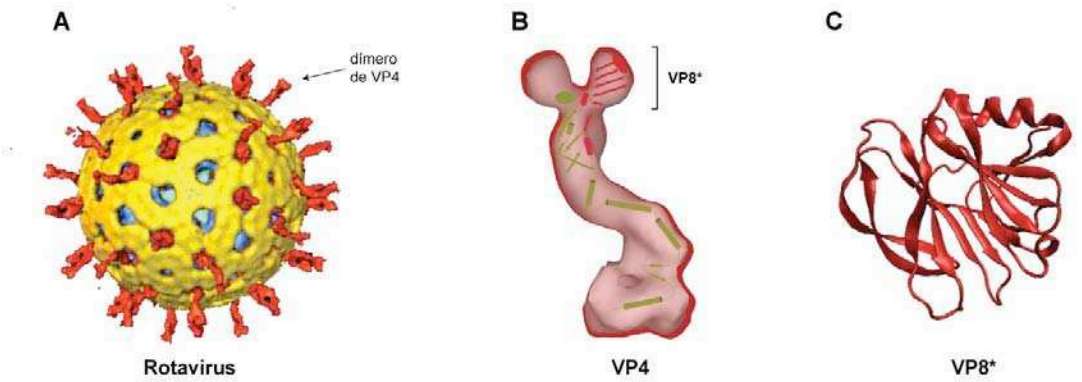

Figura 22. Estructura del rotavirus y el antígeno VP8*. A) Estructura del virión de rotavirus de mono rhesus (resolución: 23 Å), obtenida mediante crioelectromicroscopía y procesamiento de imágenes por computadora. El diámetro de la partícula es de 1000 Å. Las espículas compuestas por dímeros de VP4 se encuentran coloreadas en rojo (tomado de Prasan y Estes, 2000). **B)** Modelo de un monómero de VP4, en el cual se indica el producto de corte por tripsina: VP8* (adaptado de Tihova y col., 2001). **C)** Estructura de VP8* de rotavirus de mono rhesus (tomado de Chen y col., 2009).

Los trabajos realizados en nuestro laboratorio y por otros grupos de investigación, muestran que la disponibilidad de una tecnología de transformación genética no es una condición suficiente para obtener eventos útiles que se conviertan evantualmente en un potencial producto comercial. El rendimiento final de una determinada proteína, depende de una elevada síntesis y de la estabilidad de la misma. En esta seccion, para optimizar la expresión de VP8* en cloroplastos de tabaco se exploraron tres estrategias diferentes: a) expresar VP8* en el estroma, b) dirigir su expresión al lumen de los tilacoides, y c) expresar la proteína en estroma como una fusión a la enzima β-glucuronidasa.

Resultados

Desarrollo de las construcciones para la generación de plantas de tabaco transplastómicas que expresan VP8*.

Se obtuvo la secuencia de VP8* a partir del plásmido pGEM/VP8* (Mozgovoj y col., 2004b). Esta secuencia fue subclonada en el vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr (Wirth y col., 2006), obteniéndose así la construcción pBSW-utr/VP8* (figura 23A). Para esto, se amplificó la secuencia de VP8* de rotavirus bovino C486 a partir de la construcción pGEM/VP8*, mediante PCR con la enzima *Pfu*, utilizando los oligonucleótidos iniciadores VP8NdeI y VP8XbaI que agregaron los sitios de restricción para las enzimas NdeI y XbaI. El producto de PCR con extremos romos fue ligado con el vector pZErO-2 (Invitrogen), previamente cortado con la enzima EcoRV. La construcción intermediaria pZErO-2/VP8* fue cortada con las enzimas NdeI y XbaI, y el fragmento VP8* fue ligado al vector pBSW-utr, obtenido a partir del plásmido pBSW-utr/hEGF (Wirth y col., 2006), que había sido previamente cortado con las mismas enzimas para remover hEGF.

Como comentara previamente, y con el fin de explorar otras alternativas de expresión de VP8* en plantas transplastómicas, se realizaron dos construcciones adicionales: str-VP8* y GUS-E-VP8*. La construcción str-VP8* contiene el péptido bipartito de direccionamiento a lúmen de tilacoides de la proteína OE23, clonado por el Lic. Mauro Morgenfeld como parte de su Tesis Doctoral (figura 23B). La construcción GUS-E-VP8* consistió en la fusión entre la secuencia completa de la enzima β-glucuronidasa y la de VP8*, incluyendo entre ambas la secuencia de corte reconocida por la enzima enteroquinasa (figura 23C). Para la construcción pBSW-utr/str-VP8*, se obtuvo la secuencia de VP8* con extremos NdeI y XbaI a partir de pZErO-2/VP8* digerido con las enzimas mencionadas. Este inserto fue ligado con el vector pBSW-utr/str.

La construcción pBSW-utr/GUS-E-VP8* se realizó amplificando la secuencia de la β-glucuronidasa por PCR a partir del plásmido pBI121 (Chen y col., 2003), agregando los sitios para las enzimas NdeI en su extremo 5' y los sitios HindIII, ClaI y XbaI en su extremo 3'. El producto de PCR fue subclonado en el vector pZErO-2 (Invitrogen), y esta construcción intermediaria fue cortada con las enzimas NdeI y XbaI. El fragmento resultante fue ligado al vector pBSW-utr, obteniéndose la construcción pBSW-utr/GUS. La secuencia de VP8*, con extremos compatibles (HindIII, XbaI) para su fusión con la β-glucuronidasa, fue obtenida por PCR a partir de pZErO-2/VP8*, utilizando oligonucleótidos iniciadores que incluían los sitios mencionados, y también la secuencia para corte reconocida por la enzima enteroquinasa (E). El producto de PCR fue ligado al vector pZErO-2, la construcción pZErO-2/E-VP8* fue cortada con las enzimas HindIII y XbaI, y el inserto resultante fue ligado a la construcción intermediaria pBSW-utr/GUS que había sido tratada con los mismas enzimas. Las construcciones intermediarias pZErO-2/VP8*, pZErO-2/GUS, y pZErO-2/E-VP8*, fueron caracterizadas por mapeo de restricción y secuenciación para verificar su integridad.

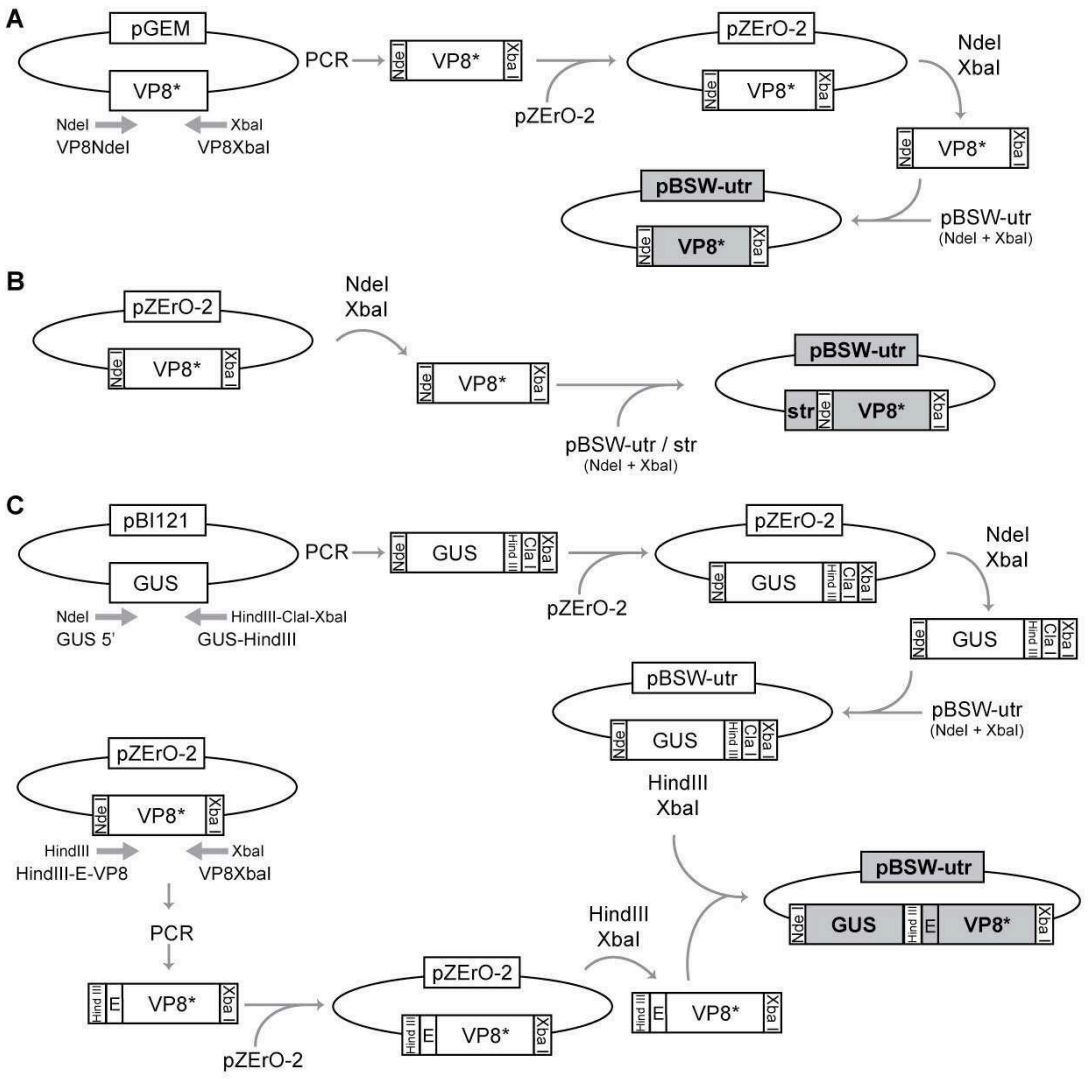

Figura 23. Construcciones para la obtención de plantas transplastómicas que expresan la proteína VP8* mediante distintas estrategias. Se indican en los esquemas los pasos seguidos para la obtención de las construcciones pBSW-utr/VP8* (**A**), pBSW-utr/str-VP8* (**B**), y pBSW-utr/GUS-E-VP8* (**C**).

Antes de realizar la transformación de plantas de tabaco, se confirmó la integridad de las construcciones mediante ensayos de *western blot*, y actividad β-glucuronidasa, realizados sobre extractos proteicos totales obtenidos de *E. coli* recombinantes (figura 24). En las bacterias que portaban la construcción pBSW-utr/str-VP8* se observó la acumulación de una VP8* truncada (VP8*-t), que podría originarse por un procesamiento erróneo de la señal bipartita "str" llevado a cabo por la maquinaria de transporte a periplasma de la bacteria (figura 24A). La construcción pBSW-utr/GUS-E-VP8* se expresó correctamente en *E. coli*, y se observó el tamaño esperado al ser comparada con las construcciones pBSW-utr/βGUS, pBSW-utr/VP-βGUS, y pBSW-utr/GUS-E-VHH, las cuales sirvieron de controles negativos para el revelado por *western blot* (figura 24B). A su vez, la fusión GUS-E-VP8* presentó actividad β-glucuronidasa comparable a la observada en bacterias transformadas con pBSW-utr/βGUS, pBSW-utr/VP-βGUS, y pBSW-utr/GUS-E-VHH, utilizadas como controles positivos. Como control negativo se utilizaron extractos proteicos de *E. coli* transformadas con el vector vacío pBSW-utr (figura 24C).

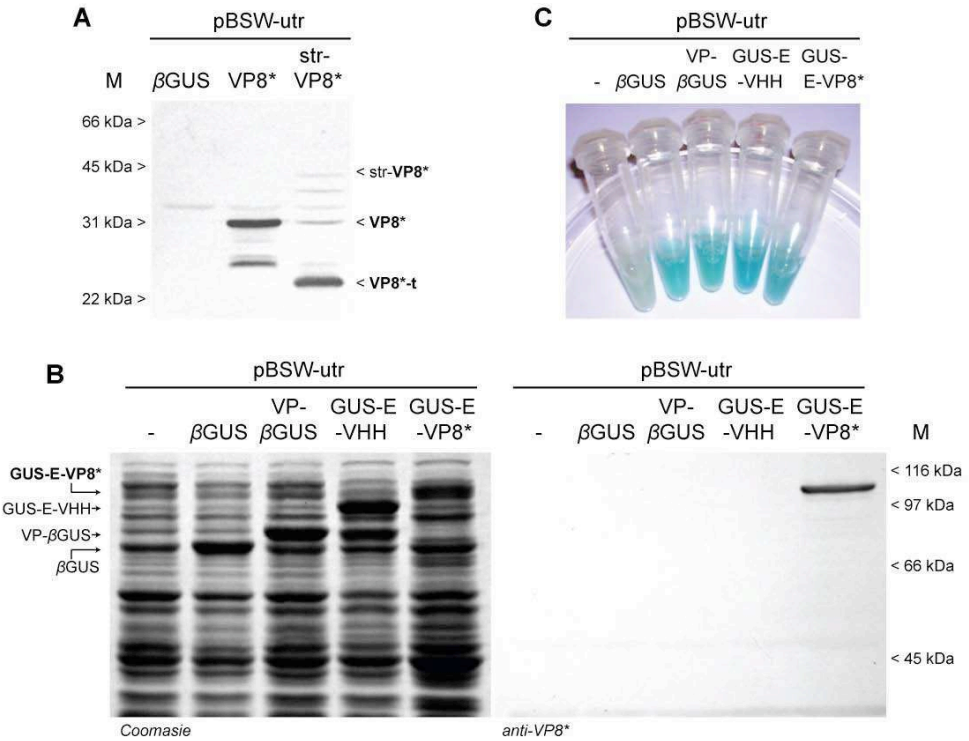

Figura 24. Análisis de la integridad y funcionalidad de las construcciones que contienen la secuencia de VP8* en *E. coli*. A) Extractos proteicos de *E. coli* transformadas con las construcciones pBSW-utr/VP8* y pBSW-utr/str-VP8*, analizados por *Western blot* (gel de poliacrilamida 12,5% [m/v]) utilizando un suero de ratón contra VP8*. Se indica la posición de VP8*, str-VP8* y un producto de degradación: VP8*-t. **B)** Extractos proteicos de *E. coli* transformadas con la construcción pBSW-utr/GUS-E-VP8* y controles analizados en un gel SDS-PAGE teñido con *Coomasie brilliant blue* y *western blot* (geles de poliacrilamida 8% [m/v]). M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD). **C)** Ensayo de actividad β-glucuronidasa.

Obtención y caracterización de plantas transplastómicas que expresan VP8*.

Se realizó la transformación de cloroplastos de tabaco por biobalística, y se obtuvieron 4 líneas transplastómicas independientes para cada construcción. Las plantas fueron caracterizadas inicialmente por PCR (figura 25B) y en el caso de las plantas GUS-E-VP8* se realizó además un análisis de actividad β-glucuronidasa (figura 25C). Las plantas desarrollaron normalmente y las semillas obtenidas fueron capaces de germinar en presencia de espectinomicina. Con el fin de lograr la homoplastía, las distintas líneas transplastómicas fueron regeneradas en presencia del agente selector tres veces, y luego rusticadas para obtener biomasa suficiente para una más profunda caracterización molecular y para los ensayos de inmunización de ratones.

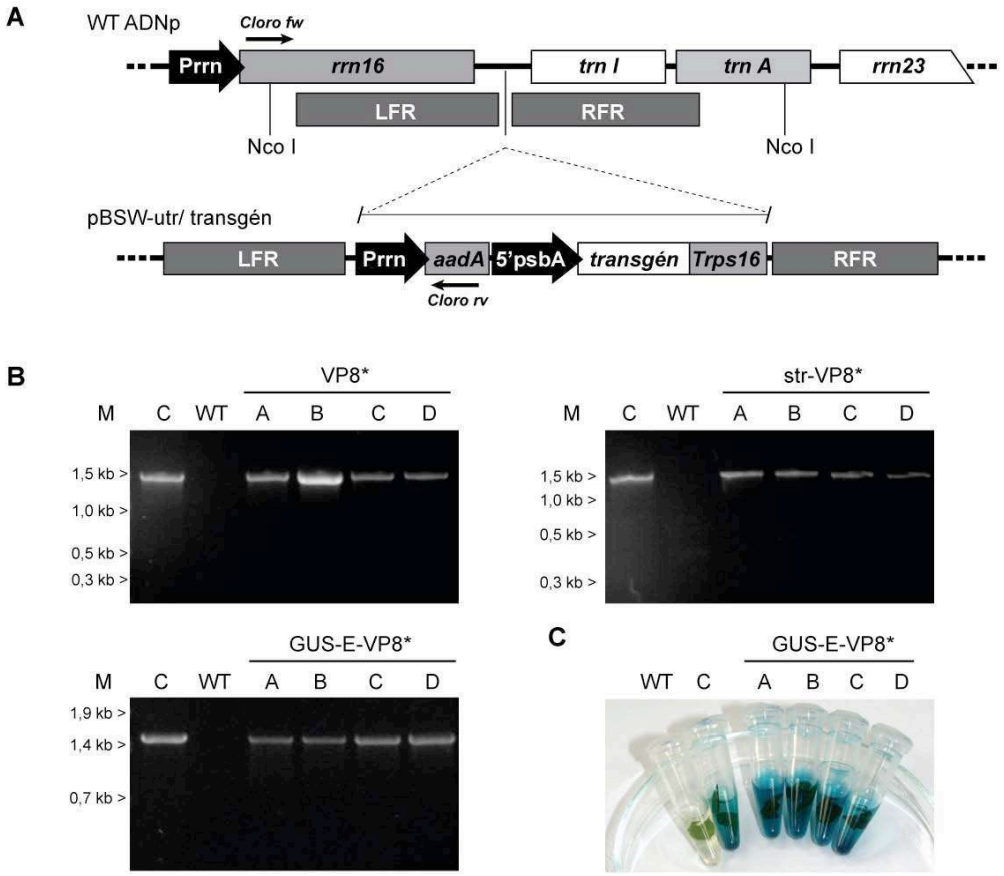

Figura 25. Identificación de líneas transplastómicas por PCR y actividad *β*-glucuronidasa. A) Esquema del sitio de integración en el genoma plastídico (WT ADNp). Se muestran los sitios donde hibridan los oligonucleótidos utilizados para la PCR: *Cloro fw* y *Cloro rv*. **B)** PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores *Cloro fw* y *Cloro rv*, que permiten amplificar un fragmento de 1.450 pb en las plantas transplastómicas (gel de agarosa 1% [m/v], tinción con bromuro de etidio). Se confirmó la naturaleza transplastómica en 4 líneas VP8*, str-VP8* y GUS-E-VP8* independientes (A, B, C y D). M: 100 *bp Ladder* (New England Biolabs) para VP8* y str-VP8*, y λ BstEII (PB-L) para GUS-E-VP8*. **C)** Ensayo de actividad *β*-glucuronidasa. C: planta transplastómica VP-*β*GUS utilizada como control positivo; WT: planta de tabaco *wild-type*.

Se confirmó la inserción del transgén por recombinación homóloga en el genoma plastídico y se estudió la homoplastía por *Southern blot* (figura 26). Se detectó de modo muy tenue la banda correspondiente al genoma *wild-type* en las plantas transplastómicas, indicando la presencia minoritaria de cloroplastos no transformados. Se detectaron por *northern blot* los ARN mensajeros conteniendo el transgén y con los tamaños los esperados, observándose una mayor abundancia del transcripto monocistrónico que se produce a partir del promotor del gen *psbA* (figura 27). En las plantas que expresaban la fusión GUS-E-VP8* no se detectó el transcripto policistrónico de mayor tamaño, sino uno de menor tamaño, posiblemente un producto de degradación.

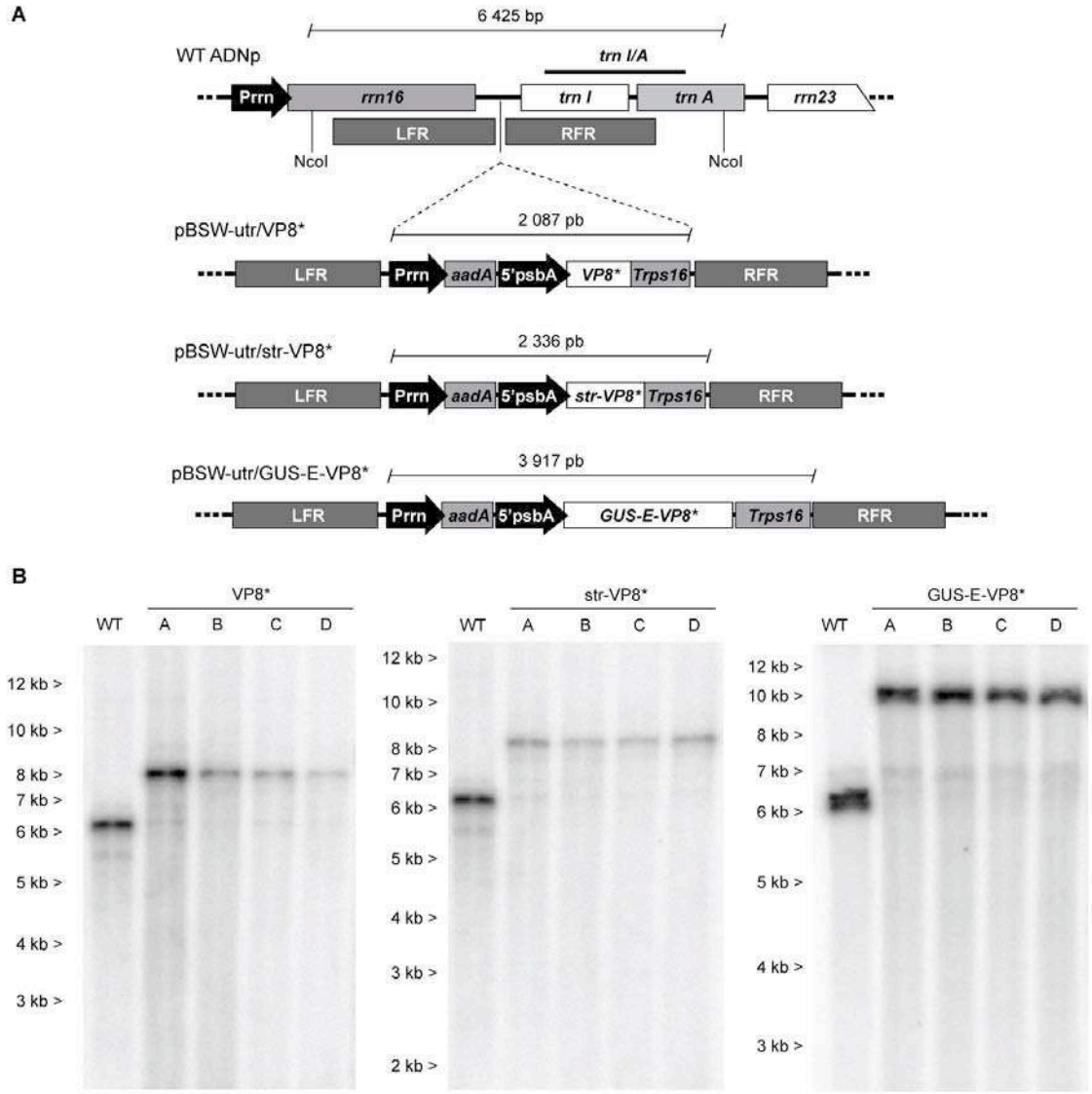

Figura 26. Análisis por *Southern blot* de plantas transplastómicas que expresan VP8*. A) Esquema que muestra la zona de inserción del transgén en el genoma plastídico (WT ADNp). Se indica el sitio de corte de la enzima NcoI utilizada en el ensayo de *Southern blot*. **B)** *Southern blot* (gel de agarosa 0,8% [m/v]) revelado con la sonda dirigida contra los genes plastídicos *trn I* y *trn A*. M: 1 kb *DNA Ladder* (PB-L); WT: planta de tabaco *wild-type*.

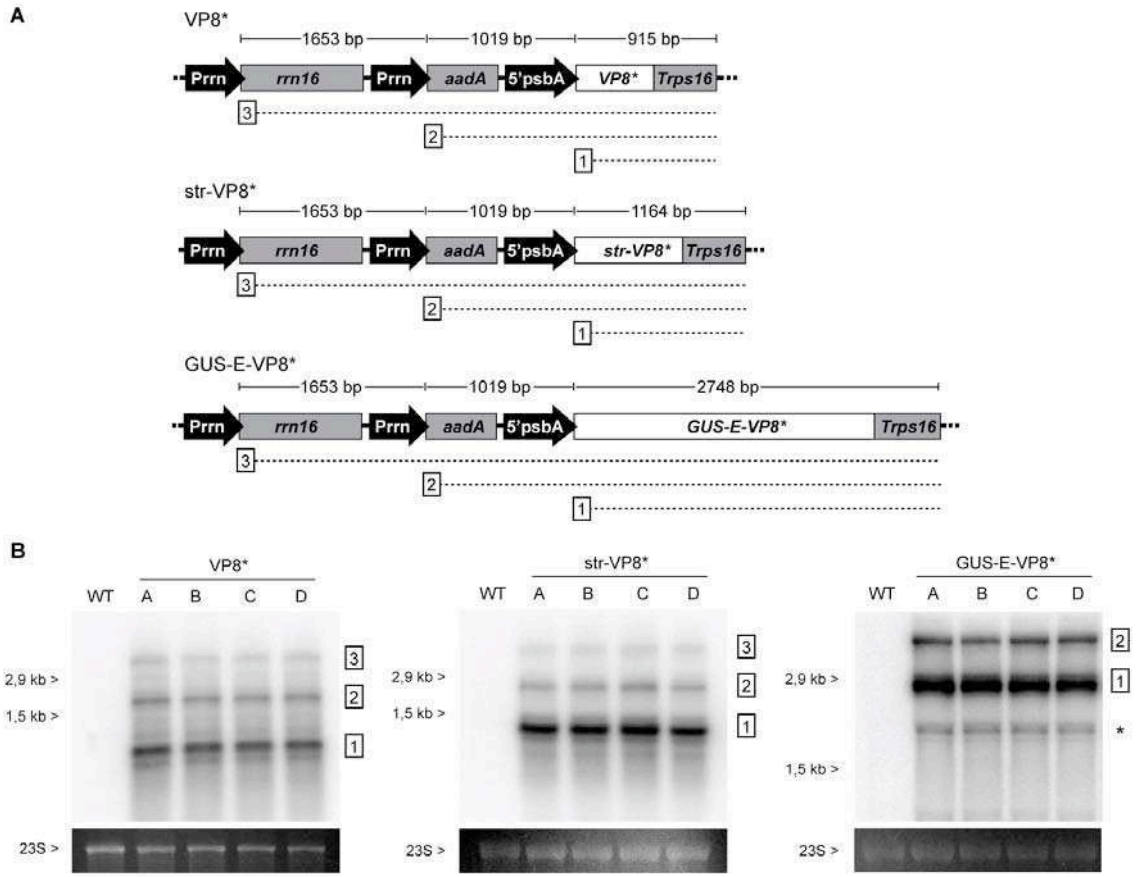

Figura 27. Análisis por *northern blot* de plantas transplastómicas que expresan VP8*. A) Mapa de transcripción donde se indican los transcriptos policistrónicos (2 y 3) y el transcripto monocistrónico (1) esperado. **B)** *Northern blot* (gel de agarosa desnaturalizante 1,5% [m/v] para VP8* y str-VP8*, y 1,2% [m/v] para GUS-E-VP8*) revelado con una sonda contra el transgén *VP8**. Se indican las posiciones de los ARN ribosomales 23S (2,9 kb) y 16S (1,5 kb) como referencia de tamaño molecular, y la banda correspondiente al 23S en el gel previo a la transferencia como control de carga. Los transcriptos esperados de acuerdo al esquema mostrado en "A" se señalan con números 1, 2 y 3. Se indica con un asterisco un posible producto de degradación en las plantas GUS-E-VP8*. WT: planta de tabaco *wild-type*.

La expresión de las proteínas recombinantes fue confirmada por SDS-PAGE y *western blot* (figura 28). En las plantas VP8*, la proteína pudo ser visualizada directamente por tinción del gel de poliacrilamida con *Coomasie Brilliant Blue*. En las plantas transformadas con la construcción str-VP8* se observó una acumulación importante de una forma de VP8* que resultaría del clivaje de la primera parte de la señal bipartita que ocurriría en el estroma (str^2-VP8*). La proteína madura de localización supuestamente tilacoidal se detectó de modo tenue, y se observó la acumulación de un producto de menor tamaño (VP8* truncada: VP8*-t). En las plantas GUS-E-VP8* los niveles de expresión fueron claramente menores a los observados para las plantas VP8* y str-VP8*, y fue necesario aumentar el tiempo de revelado para detectar la proteína recombinante por *western blot*.

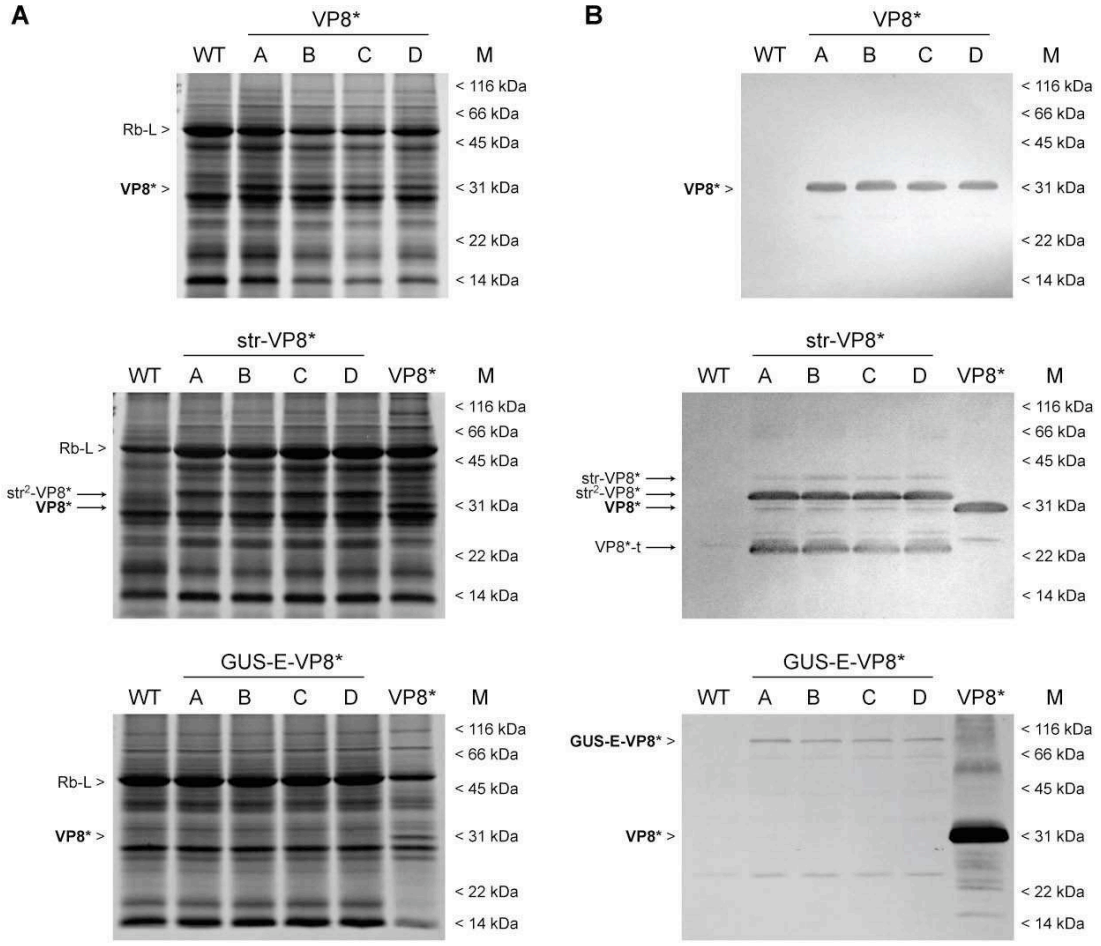

Figura 28. Análisis por SDS-PAGE y *western blot* de plantas transplastómicas que expresan VP8*. A) SDS-PAGE (12,5% [m/v]) teñido con *Coomasie Brilliant Blue* de extractos proteicos totales de hojas. Se sembraron proteínas obtenidas a partir de 4 mg de tejido fresco por calle. **B)** *Western blot* utilizando un suero de ratón contra VP8*. El gel fue sembrado del mismo modo que en "A". Para las plantas str-VP8*: la proteína no procesada se señala como str-VP8*; str^2-VP8* indica la proteína que habría perdido la primera parte de la señal bipartita de direccionamiento, y VP8*-t el producto de degradación. WT: planta de tabaco *wild-type*; Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO; M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD).

Estabilidad de la proteína recombinante en las distintas hojas de las plantas transplastómicas.

Se estudió la estabilidad de la proteína recombinante en las distintas hojas de plantas que expresaban las diferentes versiones de VP8*. En las plantas VP8* se observó una gran estabilidad de la proteína heteróloga, e incluso pudo ser detectada en las hojas senescentes (figura 29). Las otras versiones de la proteína recombinante no mostraron la misma estabilidad: en la planta str-VP8* se observó una mayor degradación a medida que aumentaba la edad de la hoja (figura 30). En el caso de las plantas GUS-E-VP8*, la proteína de fusión sólo pudo ser detectada en las hojas más jóvenes (figura 31).

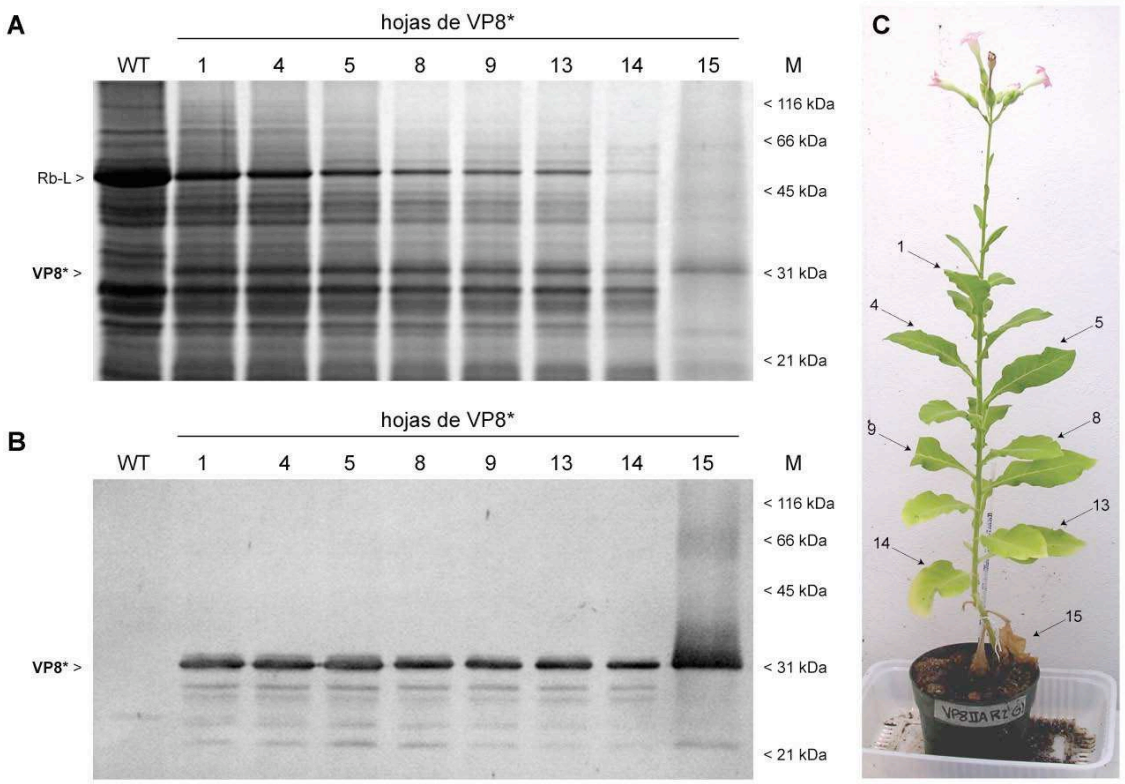

Figura 29. Estabilidad de la proteína recombinante en las distintas hojas de una planta transplastómica VP8*. A) Análisis cualitativo por SDS-PAGE (12,5% [m/v]) de extractos totales de distintas hojas de una planta transplastómica VP8* (tinción con *Coomasie brilliant blue*). Se sembraron proteínas totales de hojas obtenidas a partir de 8 mg de tejido fresco para la planta *wild-type* (WT), 4 mg de tejido fresco para las hojas 1-14 de VP8*, y 0,5 mg de tejido seco para la hoja 15. Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO. **B)** *Western blot* realizado sobre un gel equivalente al mostrado en "A", revelado con un suero de ratón contra VP8*. M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD). **C)** Planta empleada en el estudio.

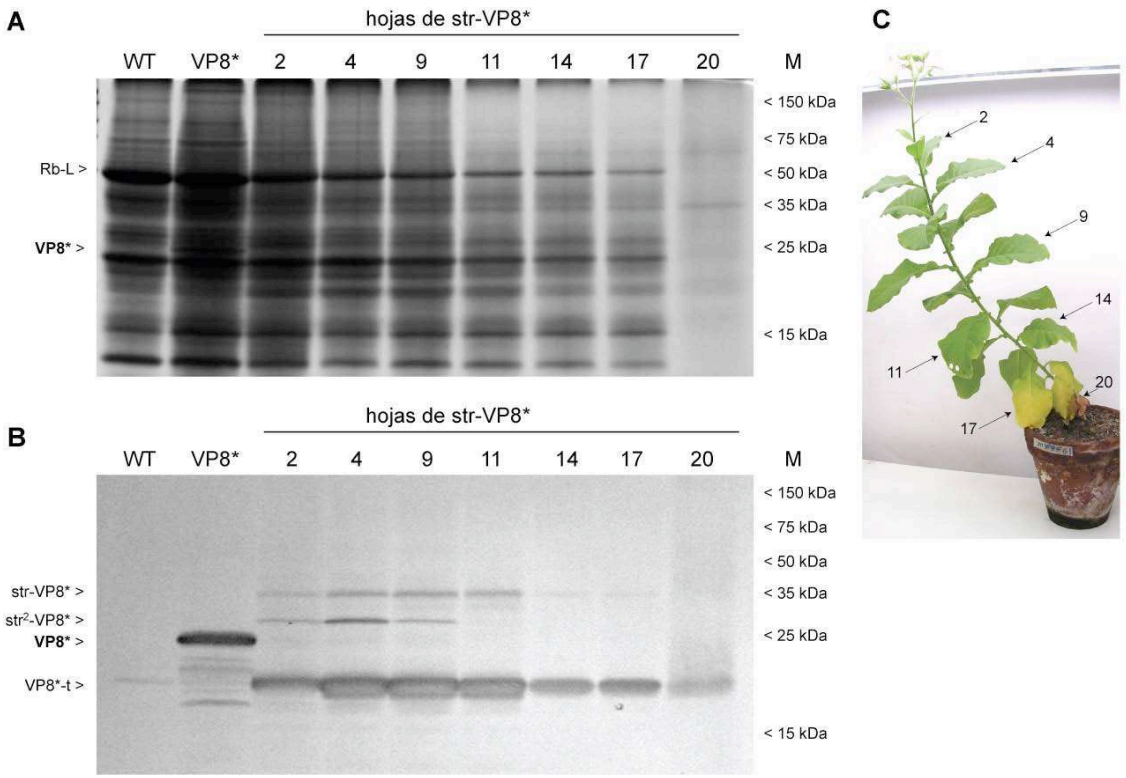

Figura 30. Estabilidad de la proteína recombinante en las distintas hojas de una planta transplastómica str-VP8*. A) Análisis cualitativo por SDS-PAGE (12,5% [m/v]) de extractos proteicos totales obtenidos de distintas hojas de una planta transplastómica str-VP8* (tinción con *Coomasie brilliant blue*). En cada calle se sembraron proteínas totales de hojas obtenidas a partir de 4 mg de tejido fresco (hojas 2-17) ó 0,5 mg de tejido seco (hoja 20). Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO. **B)** *Western blot* realizado sobre un gel equivalente al mostrado en "A" revelado con un suero de ratón contra VP8*. str-VP8*: proteína no procesada; str^2-VP8*: proteína que habría perdido la primera parte de la señal bipartita de direccionamiento; VP8*-t: producto de degradación; M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (Promega). **C)** Planta empleada en el estudio.

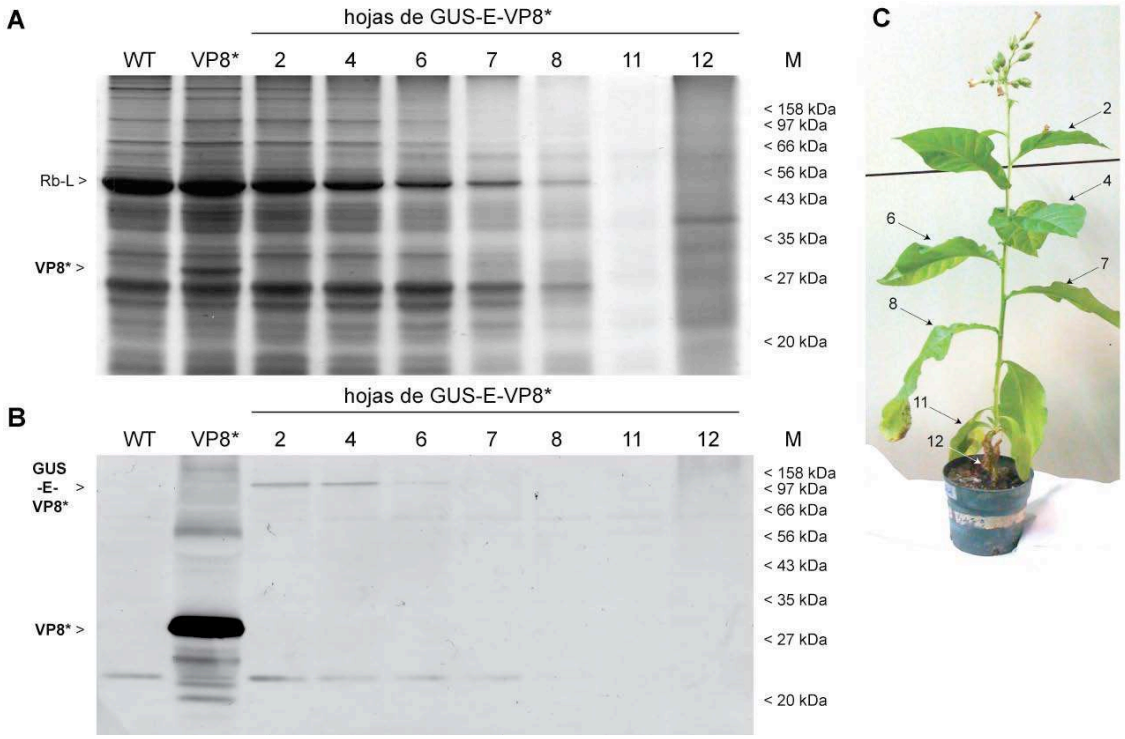

Figura 31. Estabilidad de la proteína recombinante en las distintas hojas de una planta transplastómica GUS-E-VP8*. A) Análisis cualitativo por SDS-PAGE (12,5% [m/v]) de extractos totales de distintas hojas de una planta transplastómica GUS-E-VP8* (tinción con *Coomasie brilliant blue*). En cada calle se sembraron proteínas totales de hojas obtenidas a partir de 4 mg de tejido fresco (ó 0,5 mg de tejido seco para la hoja 12). Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO. **B)** *Western blot* realizado sobre un gel equivalente al mostrado en "A" revelado con un suero de ratón contra VP8*. M: marcadores de peso molecular, *Protein Ladder* (New England Biolabs). **C)** Planta empleada en el estudio.

Solubilidad de las proteínas recombinantes.

En un ensayo preliminar con una planta transplastómica VP8* se observó que la proteína recombinante se encontraba mayoritariamente en forma insoluble. Fue necesario incluir entonces, en el protocolo de extracción, un paso de sonicación para obtener VP8* en la fase soluble del extracto (figura 32).

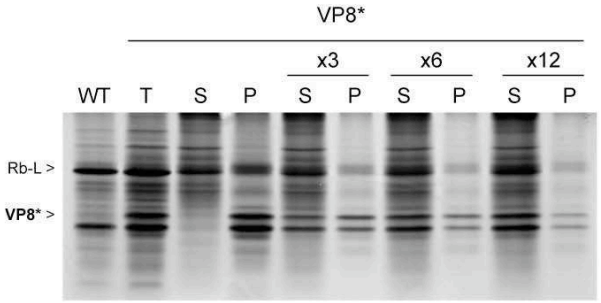

Figura 32. Análisis preliminar por SDS-PAGE de fracciones solubles e insolubles de extractos proteicos de una planta VP8*. SDS-PAGE (12,5% [m/v]) teñido con *Coomasie Brilliant Blue* de extractos totales de hoja (T), y de la fracciones solubles (S) e insolubles (P). Se analizaron en paralelo los extractos obtenidos mediante un protocolo que omite la sonicación, y otros que incluyen un número creciente de pulsos de 15 s de sonicación (x3, x6 y x12). Se sembraron proteínas de hojas obtenidas de 4 mg de tejido fresco inicial por calle. WT: planta de tabaco *wild-type*; Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO.

La insolubilidad de la proteína recombinante también fue observada en las plantas str-VP8*, parcialmente para la forma str^2-VP8* de supuesta localización estromal, pero no para la proteína madura VP8* y su producto de degradación VP8*-t, que se encontrarían solubles en el lúmen de los tilacoides. En las plantas GUS-E-VP8*, la proteína de fusión fue totalmente soluble (figura 33).

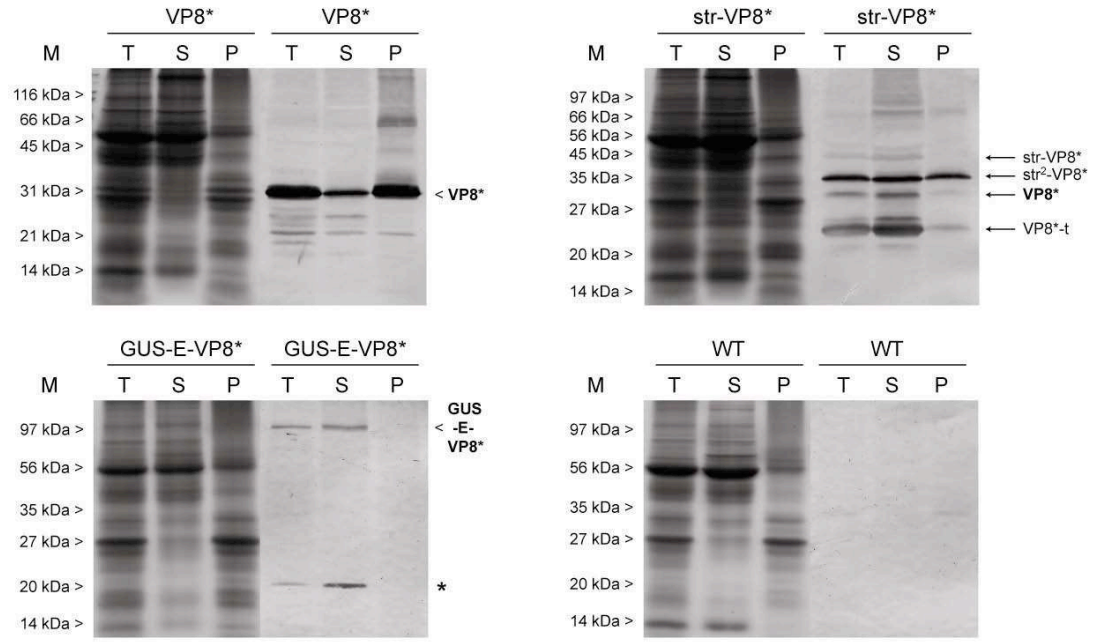

Figura 33. Análisis de la solubilidad de la proteína recombinante en plantas que expresan distintas versiones de VP8*. Extractos totales de hoja (T), la fracción soluble (S) y la fracción insoluble (P), fueron analizados por SDS-PAGE (12,5% [m/v]) teñido con *Coomasie Brilliant Blue* (izquierda) y *western blot* utilizando un suero de ratón contra VP8* (derecha). En cada calle se sembraron proteínas obtenidas a partir de 4 mg de tejido fresco. Para la planta str-VP8*: la proteína no procesada se señala como str-VP8*; str^2-VP8* indica la proteína que habría perdido la primera parte de la señal bipartita de direccionamiento, y VP8*-t el producto de degradación. Para la planta GUS-E-VP8*: se señala con un asterisco una proteína endógena que es reconocida por el suero anti-VP8* al aumentar el tiempo de revelado. WT: planta de tabaco *wild-type*; M: marcadores de peso molecular: *Broad Range* (BIO-RAD) para el análisis de la planta VP8*, y *Protein Ladder* (New England Biolabs) para los otros geles.

En base a estos resultados, se decidió utilizar un protocolo optimizado para la extracción de proteínas que forman cuerpos de inclusión de *E. coli* que no utiliza agentes desnaturalizantes (Peternel y col., 2008). El protocolo permite la obtención de modo sucesivo de fracciones solubles e insolubles, y utilizando el mismo, la proteína VP8* se repartió en todas estas fracciones (figura 34). La fracción insoluble final (P2), se encontraba altamente enriquecida en la proteína recombinante, y prácticamente libre de proteínas endógenas de la planta. En la planta str-VP8* se observó el mismo patrón en la extracción de la forma str^2-VP8*, y la forma truncada VP8*-t se obtuvo mayoritariamente en la fracción soluble S1. La proteína de fusión GUS-E-VP8* también se obtuvo en la fracción soluble S1, lo cual fue consistente con la solubilidad observada previamente. La proteína VP-βGUS, sirvió como control de una proteína

localizada en estroma que se acumula en altos niveles y que mantiene su solubilidad, ya que se extrajo mayoritariamente en la fracción S1.

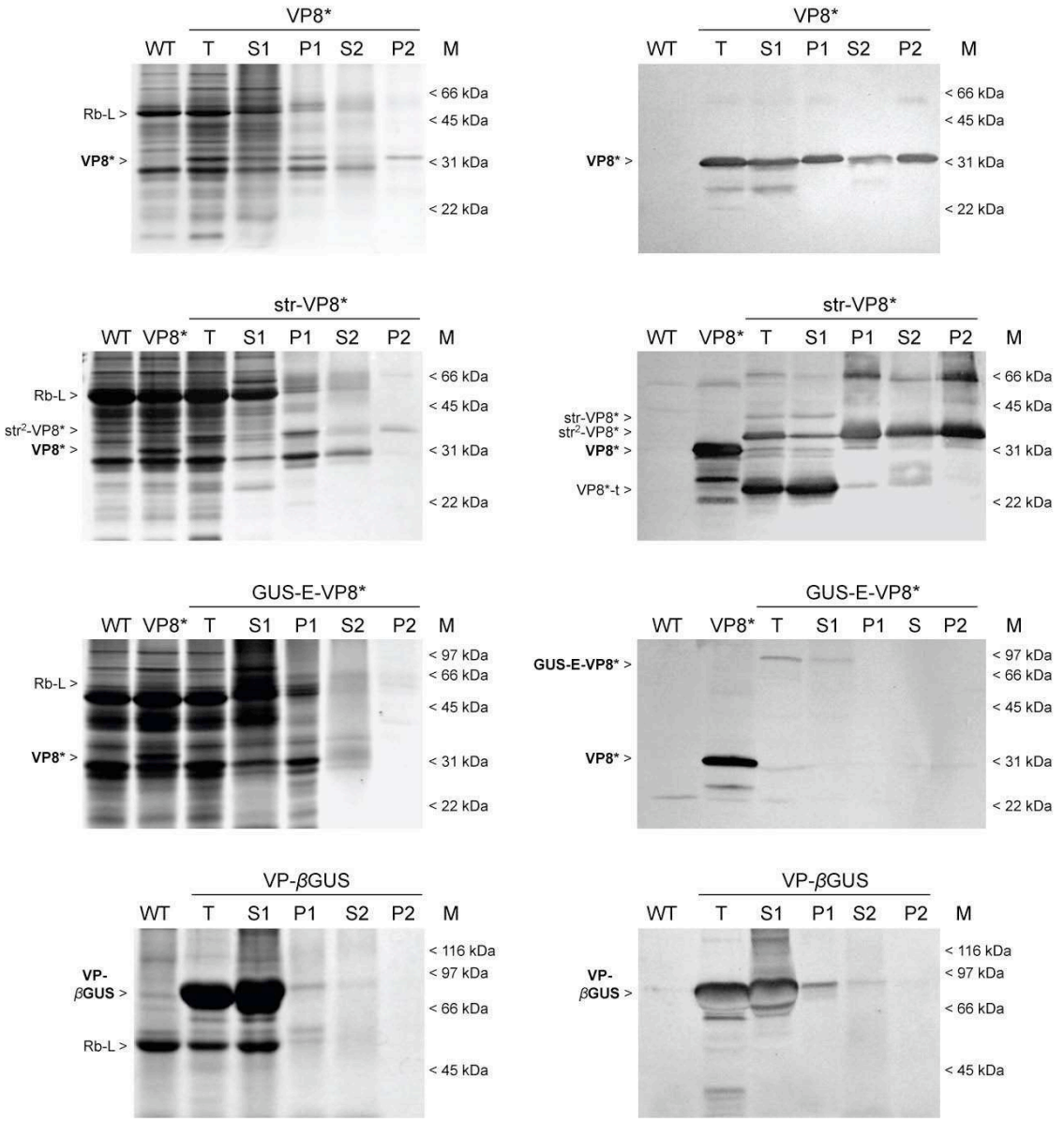

Figura 34. Extracción de proteínas de hojas a partir de las plantas que expresan distintas versiones de VP8*. SDS-PAGE (12,5% [m/v]) teñido con *Coomasie Brilliant Blue* (izquierda) y *western blot* utilizando un suero de ratón contra VP8* (derecha). Se prepararon extractos totales de hoja (T), y de las fracciones S1 (soluble), P1 (insoluble), S2 (soluble obtenido a partir de P1) y P2 (insoluble). En cada calle se sembraron proteínas de hoja obtenidas a partir de 4 mg de tejido fresco. Para las plantas str-VP8*: la proteína no procesada se señala como str-VP8*; str^2-VP8* indica la proteína que habría perdido la primera parte de la señal bipartita de direccionamiento, y VP8*-t el producto de degradación. VP-βGUS: planta transplastómica control, para la cual se utilizaron geles de poliacrilamida 8% (m/v); el *western blot* fue revelado con un suero de ratón contra el epítope contenido en los aminoácidos 135-160 de VP1 del VFA. WT: planta de tabaco *wild-type*; Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO; M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD).

Mediciones de nicotina en extractos proteicos de plantas VP8*.

Las plantas VP8* que serían utilizadas posteriormente en los ensayos de inmunización, fueron analizadas con el fin de determinar el contenido de nicotina en las fracciones solubles S1 y S2, y en la fracción insoluble final P2. Al analizar extractos obtenidos a partir de hojas secas, se obtuvieron valores de nicotina similares a los observados en plantas no transformadas (Shi y col., 2006). Se encontró, para el tejido seco (TS), un valor de nicotina total de 6,84±1,62 mg/g TS, que se encontraba casi en su totalidad en la fracción soluble S1 (figura 35). Al analizar tejido fresco (TF) el valor de nicotina fue de 0,19±0,04 mg/g TF, y en este caso también se observó que la nicotina se encontraba en la fracción S1, quedando la fracción insoluble final P2 libre del alcaloide.

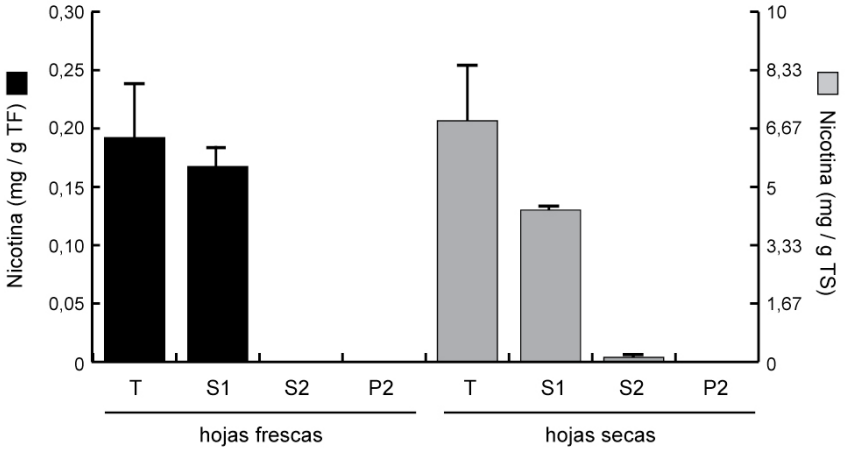

Figura 35. Contenido de nicotina en extractos proteicos de hojas de plantas VP8*. Se cuantificaron los niveles de nicotina en el extracto total de hoja (T), en las fracciones solubles S1 y S2 y en la fracción insoluble final P2. Los valores mostrados corresponden al promedio de tres determinaciones independientes, y se expresan como miligramos de nicotina por gramo de tejido fresco (mg/g TF) o seco (mg/g TS).

Localización intracelular de las proteínas recombinantes.

Con el fin de determinar la localización de las proteínas recombinantes en el cloroplasto de las plantas transplatómicas que expresan VP8* se realizó un fraccionamiento subcelular, utilizando para ello un protocolo adaptado del trabajo original de Kieselbach y colaboradores (1998), que posteriormente fue modificado para demostrar la translocación de aprotinina recombinante al lumen de los tilacoides, en plantas transplastómicas de tabaco (Tissot y col., 2008). A partir de hojas de plantas rusticadas se obtuvieron las distintas fracciones enriquecidas en proteinas de estroma, lumen y membranas de tilacoides (figura 36a). Para confirmar la identidad de las fracciones se realizaron ensayos de *western blot*, con anticuerpos dirigidos contra la subunidad mayor de RuBisCO como marcador de estroma y anticuerpos contra plastocianina como marcador del lumen de los tilacoides. Se pudo apreciar que las fracciones obtenidas se encontraban enriquecidas con las proteínas esperadas, de acuerdo a lo observado con las proteínas marcadoras, y a su vez que había una leve contaminación entre las fracciones (figura

36b). Como era esperado, la proteína de fusión GUS-E-VP8* mostró estar enriquecida en la fracción estromal. En la planta VP8*, la localización de la proteína recombinante tuvo un patrón distinto al esperado. En lugar de observarse una localización estromal, se observó que VP8* se encontraba enriquecida en la fracción de lumen y membranas de tilacoides. Este resultado inesperado puede deberse a la insolubilidad de VP8*, que provocaría su precipitación junto al *pellet* de tilacoides. Luego, VP8* sería parcialmente solubilizada obteniéndose junto a las proteínas del lumen debido a la sonicación incluida en el protocolo para la ruptura de los tilacoides. En la planta str-VP8* se observó el mismo patrón para la forma str^2-VP8*, que también es insoluble: se encontró enriquecida en la fracción de lumen y membranas de tilacoides en vez de observarse en la fracción estromal. La forma truncada de VP8* (VP8*-t), se detectó enriquecida en la fracción lumenal. Esto sugeriría que una vez que VP8* es translocada al lumen de los tilacoides, se mantiene en forma soluble donde sería clivada por alguna proteasa allí presente.

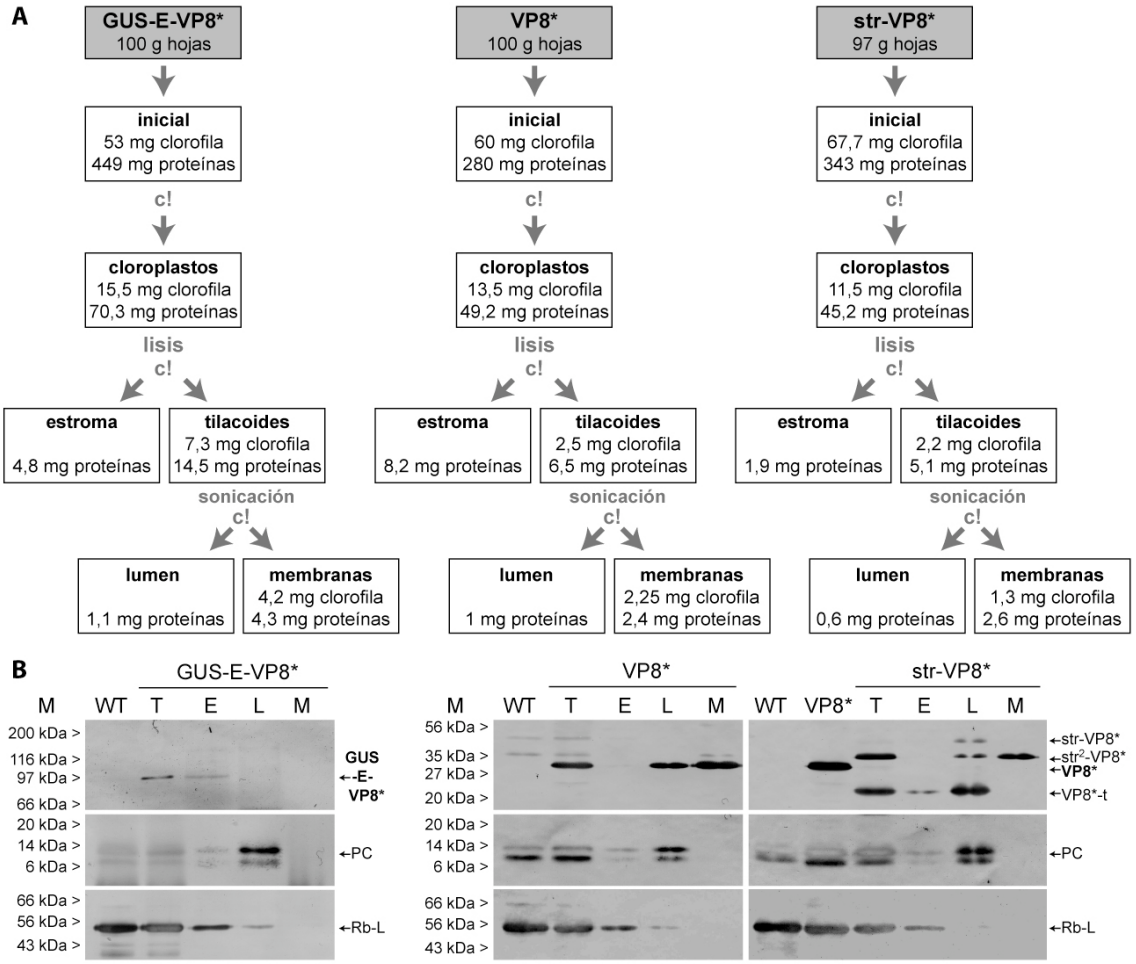

Figura 36. Fraccionamiento subcelular para el estudio de la localización de las proteínas recombinantes en cloroplastos de plantas transplastómicas que expresan VP8*. **A)** Esquema general del protocolo utilizado para obtener las fracciones enriquecidas en proteínas de distintos compartimentos del cloroplasto, y mediciones de proteínas y clorofila total para cada fraccionamiento (c!: centrifugación). **B)** Se sembraron extractos totales de hoja (T), y 10 μg de las fracciones "estroma" (E), "lumen" (L) y "membranas de tilacoides" (M). Panel superior: *western blot* (gel de poliacrilamida 10% [m/v] para GUS-E-VP8* y gel 12,5% [m/v] para VP8* y str-VP8*) de las distintas fracciones utilizando un suero de ratón contra VP8*. Panel intermedio: *western blot* (gel de poliacrilamida 15% [m/v]) utilizando un

suero de conejo contra plastocianina (PC). Panel inferior: *western blot* (gel de poliacrilamida 10% [m/v]) utilizando un suero de conejo contra la subunidad mayor de RuBisCO (Rb-L). Para las plantas str-VP8*: la proteína no procesada se señala como str-VP8*; str^2-VP8* indica la proteína que habría perdido la primera parte de la señal bipartita de direccionamiento, y VP8*-t el producto de degradación. WT: planta de tabaco *wild-type*; M: marcadores de peso molecular, *Protein Ladder* (New England Biolabs).

Cuantificación de los niveles de expresión de VP8*.

Dado que en las plantas str-VP8* se observó una proteólisis inesperada de la proteína recombinante, y en las plantas GUS-E-VP8* los niveles de expresión eran relativamente muy bajos, se decidió seguir trabajando solo con las plantas VP8*. Se cuantificaron los niveles de expresión para esta línea, a partir de un extracto soluble de hojas. Estos extractos serían luego utilizados para los estudios inmunológicos en el modelo murino. La cuantificación de VP8* en la fracción soluble se realizó por dos métodos: mediante densitometría en geles de poliacrilamida teñidos con *Coomasie Brillant Blue*, utilizando como patrón una curva de BSA (figura 37), y mediante la técnica de ELISA. Según la determinación por densitometría, VP8* representaría el 3% de las PST (230 μg/g TF); la cuantificación por ELISA realizada por la Dra. Marina Mozgovoj, arrojó resultados similares: 4% de las PST (250 μg/g TF). Al utilizarse la fracción insoluble P2 obtenida sin incluir la sonicación en el protocolo, el rendimiento de proteína recombinante por masa de tejido se duplicó: 500 μg/g TF (medición por ELISA).

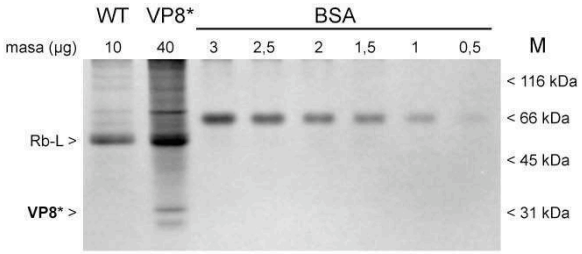

Figura 37. Cuantificación de los niveles de expresión mediante SDS-PAGE en plantas transplastómicas VP8*. Determinación de la acumulación de VP8* por densitometría en geles de poliacrilamida, utilizando el programa Image J (NIH, http://rsbweb.nih.gov/ij). SDS-PAGE (12,5% [m/v]), tinción con *Coomasie Brilliant Blue*. Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO; BSA: albúmina sérica bovina; M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD).

Inmunogenicidad y protección de la proteína recombinante VP8* en el modelo murino.

Se evaluó la inmunogenicidad y protección brindada por la proteína VP8* producida en plantas transplastómicas utilizando el modelo del ratón lactante (Mozgovoj y col., 2004). Estos estudios fueron realizados por la Dra. Marina Mozgovoj y el Lic. Demian Bellido (Instituto de Virología, CICV y A. INTA-Castelar). En la figura 38 se indica el esquema experimental seguido para las inmunizaciones y desafío con el rotavirus bovino cepa C486. Las ratonas inmunizadas ya sea con la fracción soluble S1 o con la fracción insoluble P2 desarrollaron

anticuerpos contra VP8* (figura 39A). Se observaron altos títulos en las hembras inmunizadas y posteriormente se estudió si estos anticuerpos permitían inhibir la infección del virus en un ensayo *in vitro* (figura 39B). Este ensayo permitió confirmar la presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

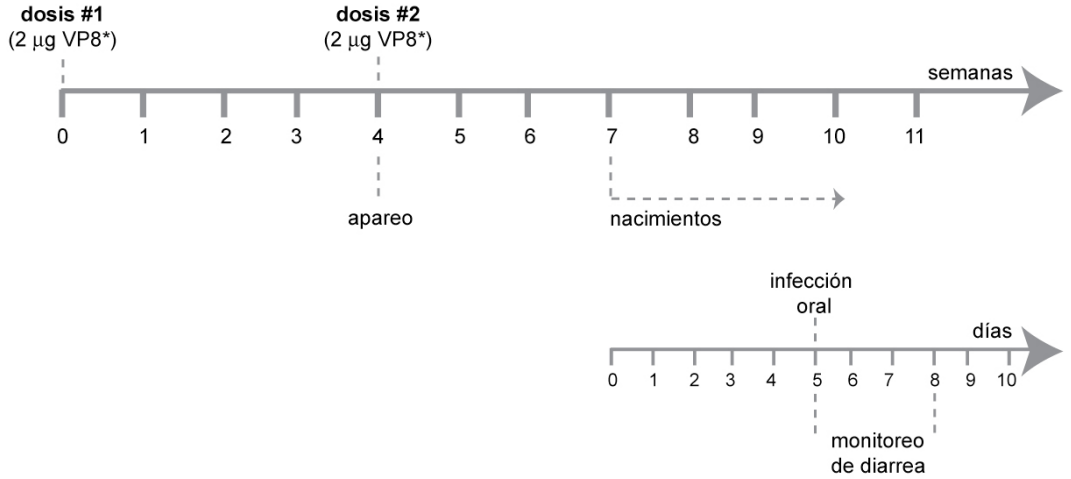

Figura 38. Esquema experimental para el estudio de la inmunogenicidad y protección brindada por VP8* en el modelo del ratón lactante. Se inmunizaron ratones BALB/C hembras con extractos de plantas VP8* conteniendo 2 μg de proteína recombinante. La inmunización se repitió a las 4 semanas y luego las hembras fueron apareadas. Sus crías fueron desafiadas al 5to día de vida con rotavirus bovino. Se monitoreó cada 24 hs la aparición de diarrea hasta el tercer día posterior a la infección.

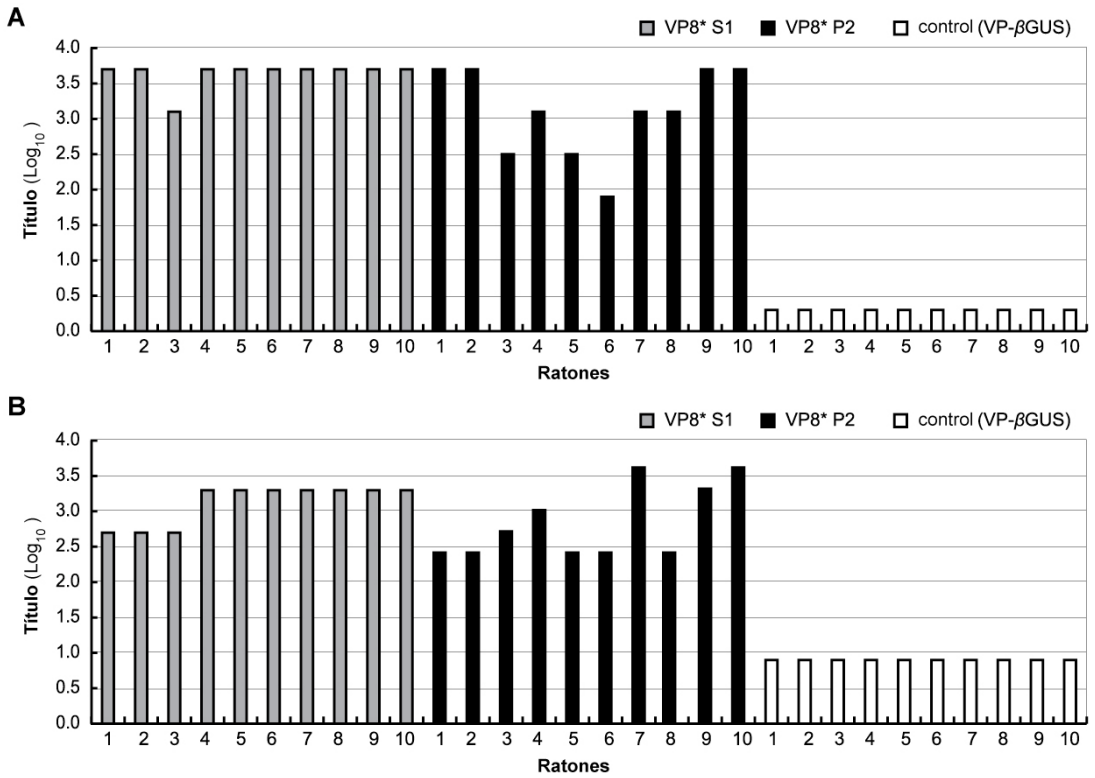

Figura 39. Immunogenicidad de VP8* producida en plantas transplastómicas. Detección de anticuerpos anti-VP8* por ELISA (**A**) y anticuerpos neutralizantes (**B**) en ratones hembras inmunizadas con extractos de plantas VP8*. Las muestras de suero fueron obtenidas a los 45 días de la primera inmunización.

Las crías nacidas de las hembras inmunizadas con extractos de plantas transplastómicas VP8* fueron protegidas frente al desafío con el virus infectivo (figura 40). Al finalizar el experimento, se detectaron IgGs contra VP8* en el suero de las crías provenientes de madres inmunizadas con extractos de plantas que expresaban este antígeno (figura 41). La presencia de estos anticuerpos transferidos de madres a crías fue consistente con la protección observada contra la infección viral.

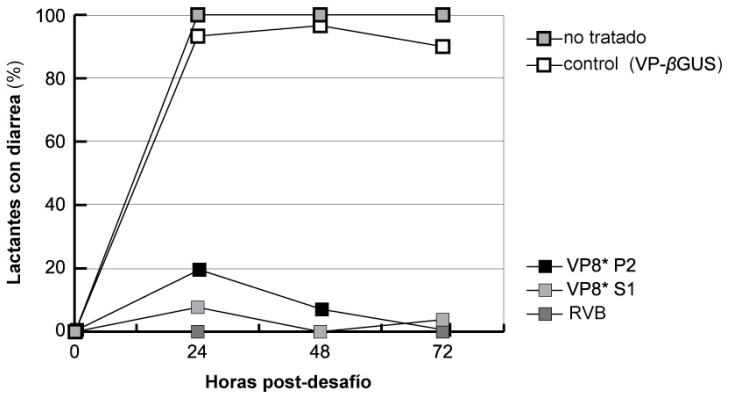

Figura 40. Protección pasiva de crías provenientes de ratones hembras inmunizadas con extractos de plantas VP8*. Crías nacidas de ratonas inmunizadas con extracto de plantas transplastómicas fueron desafiadas con 10^5 FFU de rotavirus bovino C486. Se analizaron 5 crías para cada condición y se monitoreó la aparición de diarrea diariamente hasta las 72 hs posteriores al desafío. RVB: crías de ratonas inmunizadas con un concentrado de rotavirus bovino C486 inactivado.

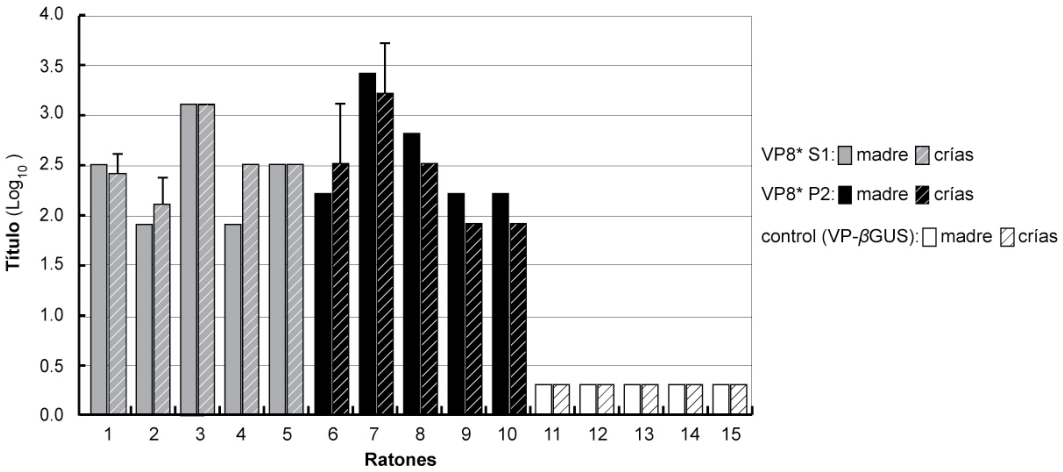

Figura 41. Transferencia de anticuerpos anti-VP8* de las hembras inmunizadas a sus crías. Los títulos de anticuerpos anti-VP8 fueron determinados por ELISA al finalizar los ensayos de desafío viral. Cada barra representa el valor obtenido para cada hembra y la barra rayada a su derecha un promedio de los valores obtenidos para 5 de sus crías.

VP8* en hojas secas de plantas transplastómicas.

Al estudiar la acumulación de VP8* en las distintas hojas de una planta transplastómica, se había observado la presencia de la proteína recombinante en las hojas senescentes e incluso en la hoja seca (figura 29). En base a esta observación se decidió estudiar la solubilidad de la proteína presente en la hoja seca empleando el protocolo descripto anteriormente que permitía obtener de modo secuencial fracciones solubles (S1, S2) e insolubles (P1, P2). De esta manera se pudo determinar que la proteína VP8* presente en la hoja seca no podía ser solubilizada, aun mediante sonicación (figura 42).

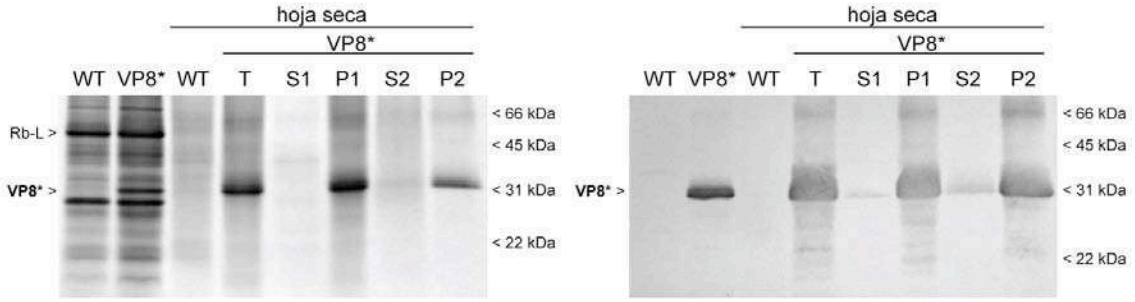

Figura 42. Extracción de proteínas en fases solubles e insolubles a partir de hojas secas de plantas transplastómicas VP8*. SDS-PAGE (12,5% [m/v]) teñido con *Coomasie Brilliant Blue* (izquierda) y *western blot* utilizando un suero de ratón contra VP8* (derecha). Se prepararon extractos totales de hoja (T), y de modo sucesivo las fracciones S1 (soluble), P1 (insoluble), S2 (soluble obtenido a partir de P1) y P2 (insoluble). Se sembraron proteínas obtenidas de 0,5 mg de hoja seca por calle, y para comparación extractos totales de hojas frescas de planta *wild-type* (WT) y VP8* (4 mg tejido fresco inicial). Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO; M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD).

Luego se confirmó que la proteína recombinante se conservaba en hojas secadas artificialmente, ya sea por falta de riego (figura 43), o mediante un procedimiento similar al utilizado por la industria para el curado del tabaco (figura 44). Se realizaron preparaciones P2 a partir del tejido seco de plantas VP8* para inocular ratones. En estas preparaciones se detectó VP8* por *western blot* pero no así por ELISA, y en experimentos de inmunización no indujeron la producción de anticuerpos.

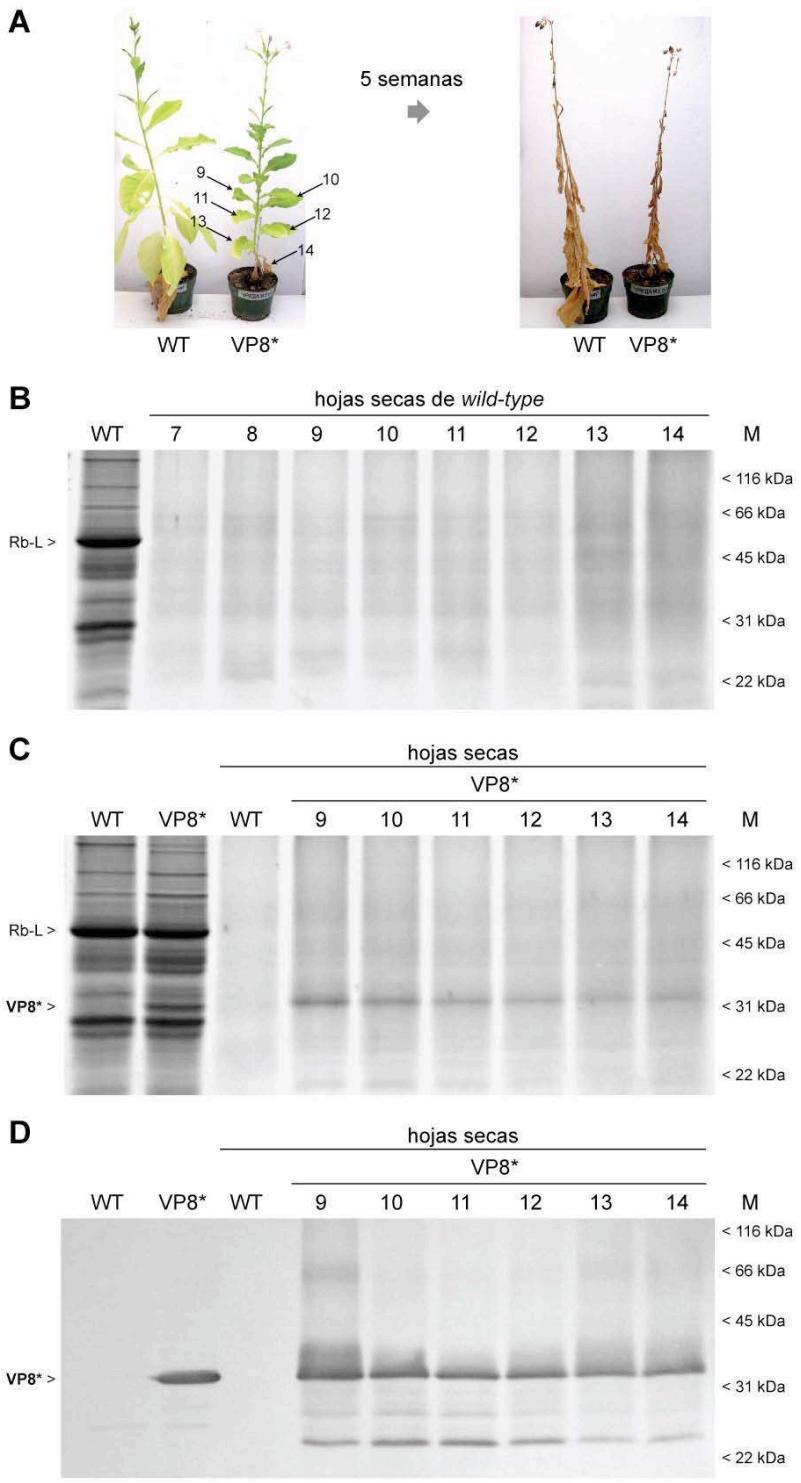

Figura 43. Detección de la proteína recombinante en hojas secadas artificialmente de plantas transplastómicas VP8*. A) Plantas utilizadas en el estudio, secadas artificialmente por falta de riego. **B)** y **C)** Análisis cualitativo por SDS-PAGE (12,5% [m/v], tinción con *Coomasie brilliant blue*) de extractos totales de distintas hojas de una planta *wild-type* y VP8*, respectivamente, que fueron secadas artificialmente. Se sembraron proteínas totales obtenidas de 4 mg de tejido fresco o 0,5 mg de tejido seco por calle. Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO. **D)** *Western blot* realizado sobre un gel equivalente al mostrado en "C" revelado con un suero de ratón contra VP8*. M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD).

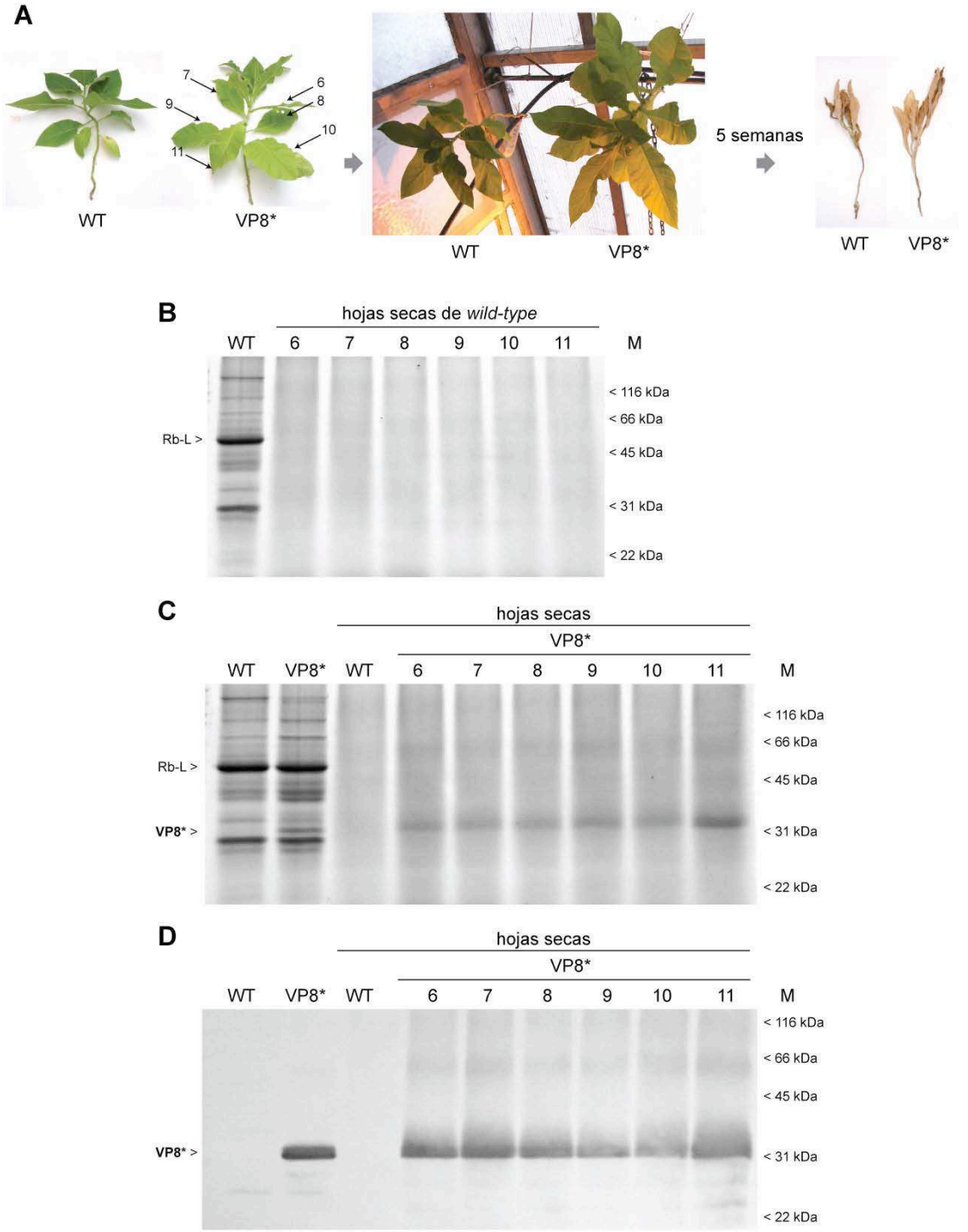

Figura 44. Detección de la proteína recombinante en hojas secadas artificialmente de plantas transplastómicas VP8* (continuación). **A)** Plantas utilizadas en el estudio, secadas artificialmente mediante un procedimiento similar al usado en la industria para el curado de tabaco. **B)** y **C)** Análisis cualitativo por SDS-PAGE (12,5% [m/v], tinción con *Coomasie brilliant blue*) de extractos totales de distintas hojas de una planta *wild-type* y VP8*, respectivamente, que fueron secadas artificialmente. Se sembraron proteínas totales obtenidas de 4 mg de tejido fresco o 0,5 mg de tejido seco por calle. Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO. **D)** *Western blot* realizado sobre un gel equivalente al mostrado en "C" revelado con un suero de ratón contra VP8*. M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD).

Parte III: Expresión de un anticuerpo de camélido de cadena simple (VHH).

Introducción

Los camélidos (camellos, dromedarios y llamas) producen anticuerpos de simple cadena, y su extremo N-terminal llamado VHH es el polipéptido mas pequeño con capacidad de unión de alta afinidad (Harmsen y De Haard, 2007). Debido a no poseer una estructura cuaternaria ya que estan formados por una única cadena de aproximadamente 15 kDa, presentan una mayor estabilidad respecto de los anticuerpos convencionales (Muyldermans y col., 2009). Su producción es realizada de rutina en *E. coli* y levaduras, obteniéndose un buen rendimiento de proteína VHH soluble (Frenken y col., 2000; van der Linden y col., 2000). Considerando la aplicación de estas moléculas en diagnóstico y terapias de inmunidad pasiva, es muy probable que su producción se realice a gran escala en los próximos años. Teniendo en cuenta esto, es interesante evaluar como plataforma de expresión alternativa de los VHH a las plantas transplastómicas. Si los niveles de expresión fueran aceptables y la purificación a partir del material vegetal no presentase complicaciones adicionales, este sistema podría representar una opción con mejor relación rendimiento/costo respecto de los sistemas basados en la fermentación.

El VHH utilizado en este trabajo fue desarrollado por la Dra. Lorena Garaicoechea como parte de su Tesis Doctoral (Garaicoechea y col., 2008). El sistema de expresión utilizado fue *E. coli*, empleando el vector pHEN6 (Conrath y col., 2001), que incluye el péptido de direccionamiento a periplasma de la proteína pectato liasa B (Better y col., 1988). En ese ambiente oxidante y libre de proteasas, se favorece la formación de puentes disulfuro intracatenarios permitiendo el correcto plegamiento del anticuerpo. A su vez, se minimiza su degradación, y se facilita la purificación mediante cromatografía de afinidad con columnas de níquel, ya que esta versión de VHH cuenta con un *tag* de polihistidinas en su extremo C-terminal. Se trabajó con el clon 3B2, el cual reconoce un epítope conformacional de la proteína VP6 del rotavirus bovino. VP6 forma parte de la capa proteica intermedia del virión, y el VHH, debido a su pequeño tamaño, podría acceder al epítope a través de los poros de la capa externa viral (figura 45). Tal es así, que el VHH mencionado expresado en *E. coli,* posee actividad neutralizante (Garaicoechea y col., 2008).

Con el fin de expresar este anticuerpo y teniendo en cuenta las alternativas comentadas en la introducción general para mejorar los niveles de expresión, se evaluaron tres estrategias para expresar el anticuerpo VHH clon 3B2 en plantas transplastómicas de tabaco: 1) expresarlo sin señal de direccionamiento para analizar su acumulación en el estroma del cloroplasto, 2) dirigir su acumulación al lumen de los tilacoides, 3) y acumularlo en el estroma como una fusión a la enzima β-glucuronidasa.

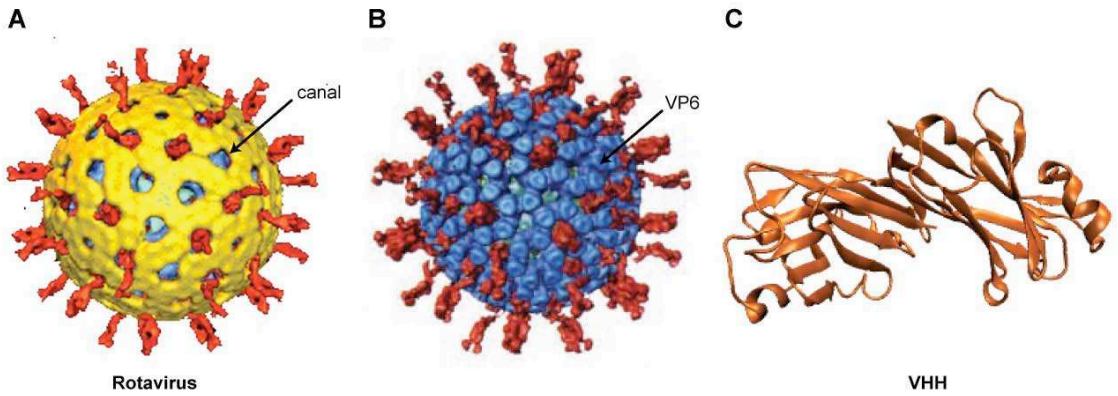

Figura 45. Estructura del rotavirus, el antígeno VP6 y un anticuerpo de simple cadena VHH. A) Estructura del virión de rotavirus de mono rhesus (resolución: 23 Å), obtenida mediante crioelectromicroscopía y procesamiento de imágenes por computadora. Los antígenos de la capa externa VP4 y VP7 se encuentran coloreados en rojo y amarillo, respectivamente. Se indica uno de los canales y dentro del mismo la proteína VP6 coloreada en azul. **B)** Estructura del virión sin la proteína de la capa externa VP7. Se resalta la capa intermedia formada por VP6 en azul ("A" y "B" tomadas de Prasan y Estes, 2000). **C)** Estructura de un anticuerpo de simple cadena de camélido (resolución: 2,10 Å) (tomado de Decanniere y col., 2000).

Resultados

Desarrollo de las construcciones para la generación de plantas de tabaco transplastómicas que expresan VHH.

Se obtuvo la secuencia de VHH a partir del plásmido pHEN6/VHH clon 3B2 (Garaicoechea y col., 2008) mediante PCR con la enzima *Pfu*, utilizando los oligonucleótidos iniciadores VHHNdeI y VHHXbaI que agregaron los sitios de restricción para las enzimas NdeI y XbaI (figura 46A). El producto de PCR con extremos romos fue ligado al vector pZErO-2 (Invitrogen), previamente cortado con la enzima EcoRV. La construcción intermediaria pZErO-2/VHH fue cortada con las enzimas NdeI y XbaI, y el fragmento VHH fue ligado al vector pBSW-utr, obtenido a partir de la construcción pBSW-utr/hEGF (Wirth y col., 2006), que había sido previamente cortado con las mismas enzimas para remover hEGF. La construcción final pBSW-utr/VHH permitiría la acumulación de VHH 3B2 en el estroma del cloroplasto.

Se realizaron dos construcciones adicionales para expresar VHH en plantas transplastómicas: pBSW-utr/pep-VHH y pBSW-utr/GUS-E-VHH. La construcción pBSW-utr/pep-VHH contiene el péptido bacteriano (pep) de direccionamiento a periplasma de la proteína pectato liasa B, que sería reconocido por la maquinaria plastídica de translocación al lúmen de los tilacoides, vía el mecanismo SEC (Aldridge y col., 2009) (figura 46B). Para obtener esta construcción, se siguieron los mismos pasos descriptos para pBSW-utr/VHH, empleando en la PCR el oligonucleótido iniciador pepVHHNdeI, que permitió incluir en la secuencia el péptido N-terminal mencionado anteriormente, presente en el plásmido pHEN6.

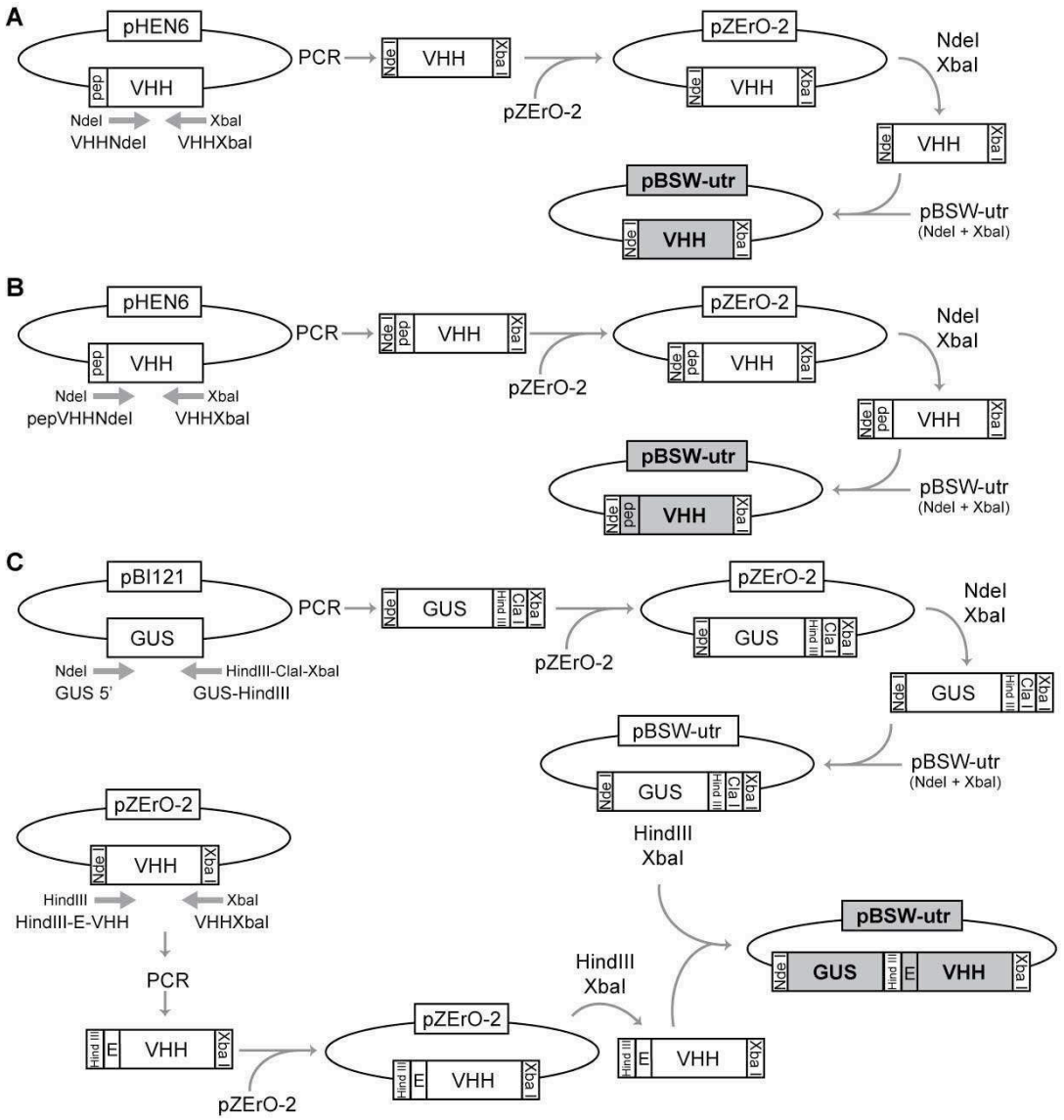

Figura 46. Construcciones para la obtención de plantas transplastómicas que expresan la proteína VHH mediante distintas estrategias. Se indican en los esquemas los pasos seguidos para la obtención de las construcciones pBSW-utr/VHH (**A**), pBSW-utr/pep-VHH (**B**), y pBSW-utr/GUS-E-VHH (**C**).

La construcción pBSW-utr/GUS-E-VHH consistió en la fusión entre la secuencia completa de la enzima β-glucuronidasa y la de VHH, incluyendo entre ambas el sitio de corte reconocido por la enzima enteroquinasa (figura 46C). Se obtuvo la secuencia de la β-glucuronidasa por PCR a partir del plásmido pBI121 (Chen y col., 2003), agregando los sitios para las enzimas HindIII, ClaI y XbaI en el extremo 3' y NdeI en el extremo 5'. El producto de PCR fue subclonado en el vector pZErO-2, y esta construcción intermediaria fue cortada con las enzimas NdeI y XbaI. El fragmento resultante fue ligado al vector pBSW-utr, obteniéndose la construcción pBSW-utr/GUS. La secuencia de VHH, con extremos compatibles (HindIII, XbaI) para su fusión con la β-glucuronidasa fue obtenida por PCR a partir de pZErO-2/VHH, utilizando oligonucleótidos iniciadores que incluían los sitios mencionados, y la secuencia para corte con la enzima enteroquinasa (E). El producto de PCR fue ligado al vector pZErO-2, y la construcción pZErO-

2/E-VHH fue cortada con las enzimas HindIII y XbaI. El fragmento resultante fue ligado a la construcción intermediaria pBSW-utr/GUS, que había sido cortada con las mismas enzimas. Para descartar mutaciones que pudieran haber sido introducidas por las reacciones de PCR, las construcciones intermediarias: pZErO-2/VHH, pZErO-2/pep-VHH, pZErO-2/GUS, y pZErO-2/E-VHH fueron secuenciadas.

Antes de realizar la transformación genética de las plantas de tabaco, se confirmó la integridad de las construcciones por *western blot* y actividad β-glucuronidasa (figura 47). En el ensayo de *western blot* no fue posible detectar la proteína VHH en extractos de bacterias que contenían la construcción pBSW-utr/VHH. Se ha observado que la expresión de las VHHs en el citoplasma de *E. coli* es inestable, y es por ello que se las dirige al periplasma (Olichon y Surrey, 2007). Aunque se utiliza la expresión en bacterias como prueba de lo que podría ocurrir en el estroma de los cloroplastos, esto no es una regla general. Es por ello que se decidió utilizar de todos modos la construcción pBSW-utr/VHH para la transformación de plantas.

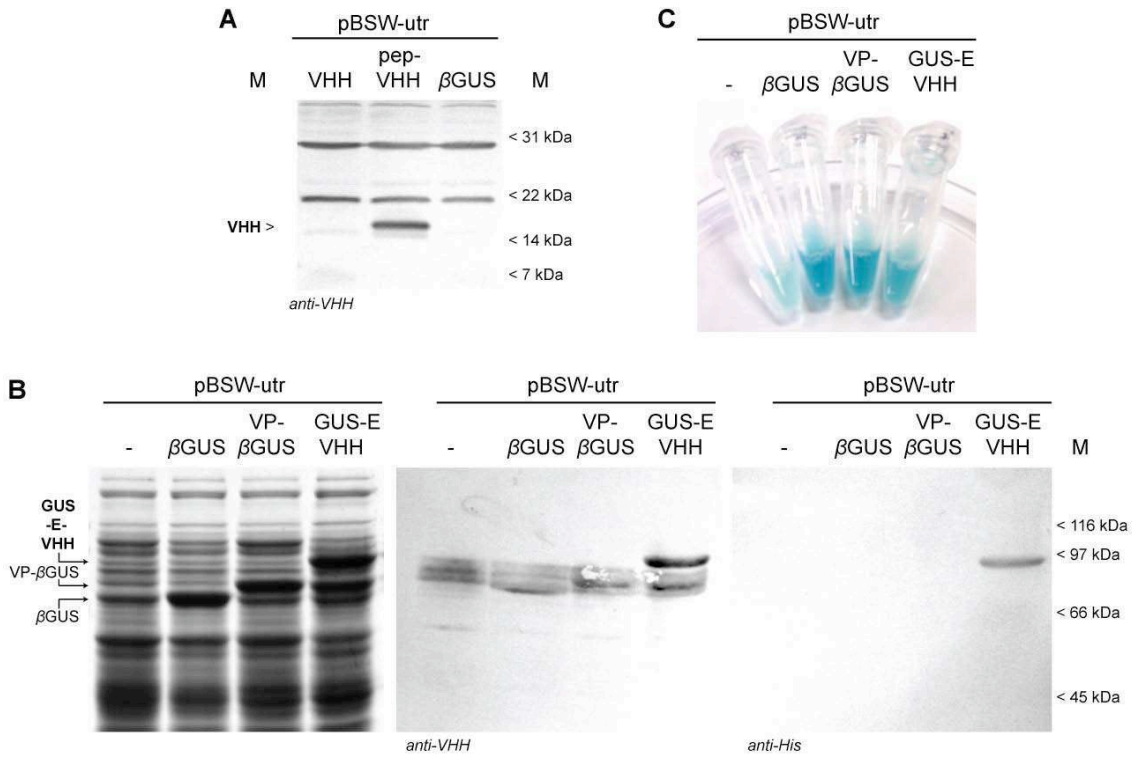

Figura 47. Análisis de la integridad y funcionalidad de las construcciones que contienen la secuencia de VHH en *E. coli*. A) *Western blot* (gel de poliacrilamida 15% [m/v]) utilizando un suero de conejo contra VHH, para analizar la expresión de las construcciones pBSW-utr/VHH y pBSW-utr/pep-VHH. **B)** SDS-PAGE teñido con *Coomasie brilliant blue* y *western blots* (geles 10% [m/v]) para analizar la expresión de la construcción pBSW-utr/GUS-E-VHH. En las inmunodetecciones se utilizó un suero de conejo contra VHH y un anticuerpo de ratón monoclonal contra el *tag* de polihistidinas (GE Healthcare). Se incluyeron las construcciones pBSW-utr/βGUS y pBSW-utr/VP-βGUS como referencia del tamaño de las proteínas recombinantes y como controles negativos en el revelado por *western blot*. M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD). **C)** Ensayo de actividad β-glucuronidasa. Se incluyeron las construcciones pBSW-utr/βGUS y pBSW-utr/VP-βGUS como controles positivos, y el vector vacío como control de actividad endógena de *E. coli*.

Obtención y caracterización preliminar de plantas transplastómicas que expresan VHH.

Se realizó la transformación de cloroplastos de tabaco por biobalística utilizando las tres construcciones conteniendo la secuencia de VHH. La eficiencia de transformación fue relativamente baja para la construcción pBSW-utr/VHH, y se necesitaron bombardear 40 explantos para obtener solo 10 brotes. Con las demás construcciones utilizadas en este trabajo solo fueron necesarios de 5 a 10 explantos bombardeados para obtener esa misma cantidad de brotes. Las plantas que surgieron de los bombardeos fueron analizadas por PCR para identificar los eventos transplastómicos (figura 48). Se observó la presencia de un número importante de escapes en la transformación con la construcción pBSW-utr/VHH.

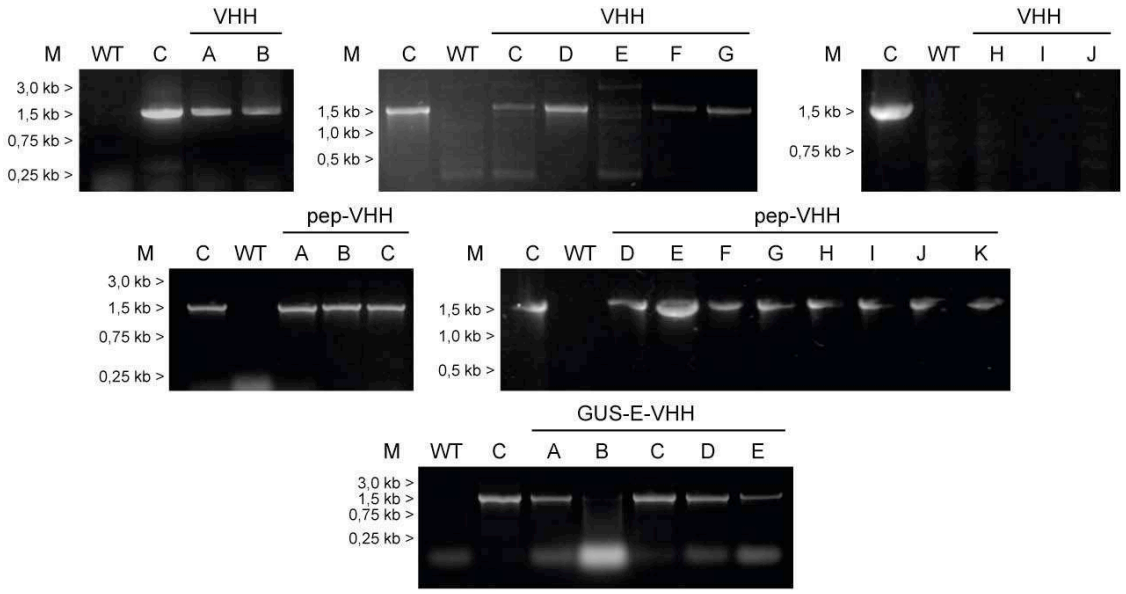

Figura 48. Identificación de líneas transplastómicas que expresan VHH por PCR. Se analizaron diferentes líneas obtenidas de los experimentos de transformación con las construcciones pBSW-utr/VHH, pBSW-utr/pep-VHH, pBSW-utr/GUS-E-VHH. En las reacciones de PCR se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores *Cloro fw* y *Cloro rv*, que permiten amplificar, sólo en las plantas transplastómicas, un fragmento de 1.450 pb. C: transplastómica VP-βGUS utilizada como control positivo; WT: planta de tabaco *wild-type*. M: 1 kb *DNA Ladder* (Promega).

Las plantas obtenidas mostraron un fenotipo heteroplástico, siendo este más acentuado en las plantas VHH (figura 49). Este fenotipo que consiste en deformaciones en las hojas, ha sido descripto por Alhert y colaboradores (2003), y resulta del arresto del desarrollo de células con cloroplastos no transformados, como consecuencia de la ausencia de actividad traduccional en presencia del agente selector. La mayoría de las plantas VHH y pep-VHH dieron semillas incapaces de germinar en medio selectivo, lo cual indicaba que al ser rusticadas en ausencia de presión de selección perdían los plastomas transformados. Esta heteroplastía observada a nivel fenotípico pudo ser confirmada mediante un ensayo de *Southern blot* preliminar con plantas VHH y pep-VHH (figura 50). En las plantas VHH se observó un patrón de bandas correspondiente al plastoma *wild-type* (6,4 kb) o bandas con tamaño mayor al esperado (8,2

kb). En todas las plantas pep-VHH analizadas se pudo detectar el genoma plastídico *wild-type* (6,4 kb), y en dos casos se visualizó simultáneamente la banda de 1,9 kb, producto de la inserción del transgén.

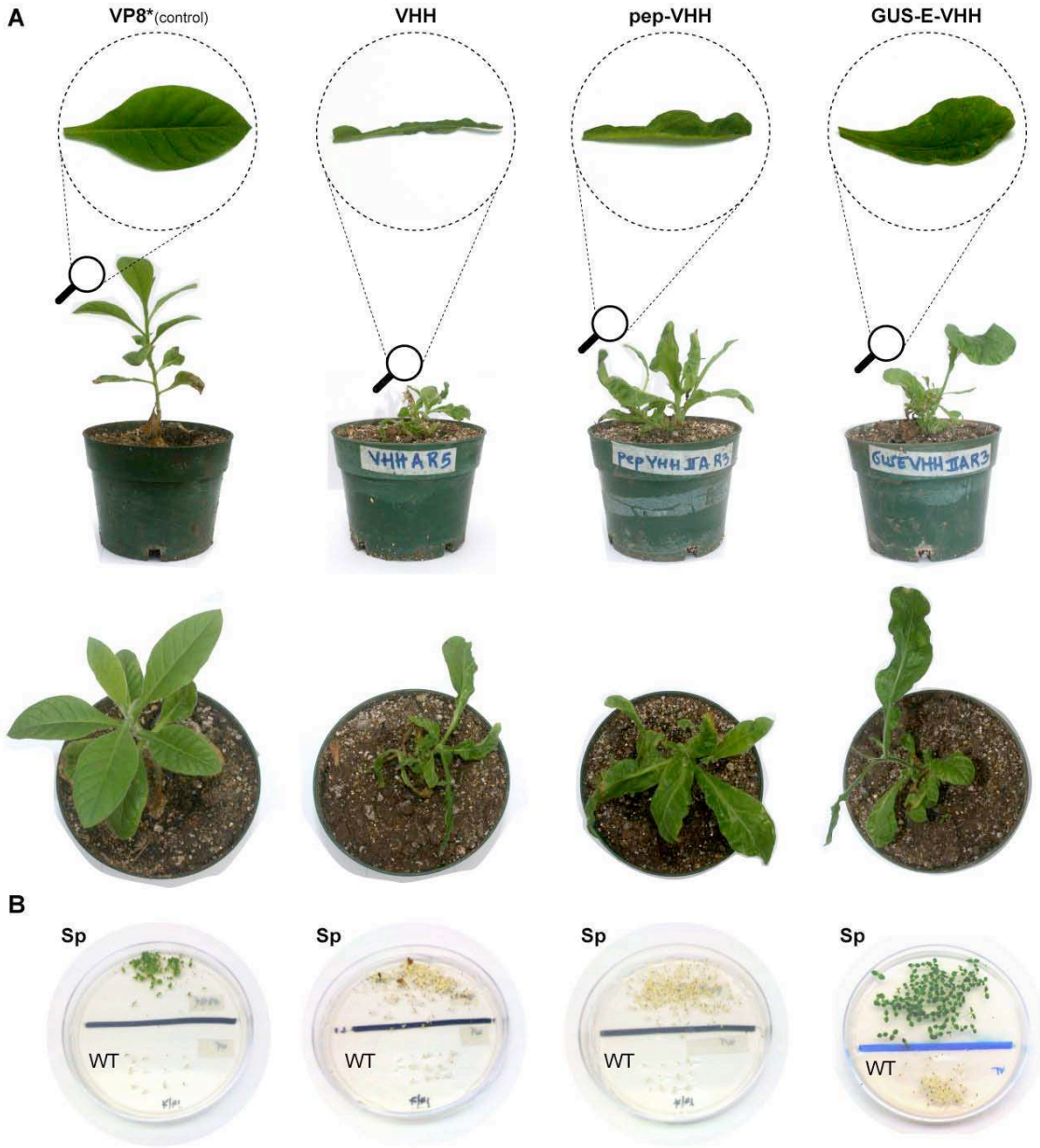

Figura 49. Fenotipo heteroplástico de plantas transplastómicas que expresan VHH. A) Fotografías de una planta VHH (quinta ronda de regeneración), pep-VHH y GUS-E-VHH (ambas de tercera ronda de regeneración), luego de 2 semanas de haber sido rusticadas. Se incluye una planta VP8* como referencia de una planta transplastómica que no presenta fenotipo heteroplástico. **B)** Semillas de las plantas que se muestran en "A" fueron germinadas en medio MS en presencia de espectinomicina (Sp, 500 mg/L). En las mismas placas se incluyeron semillas de plantas de tabaco *wild-type* (WT) como control del agente selector.

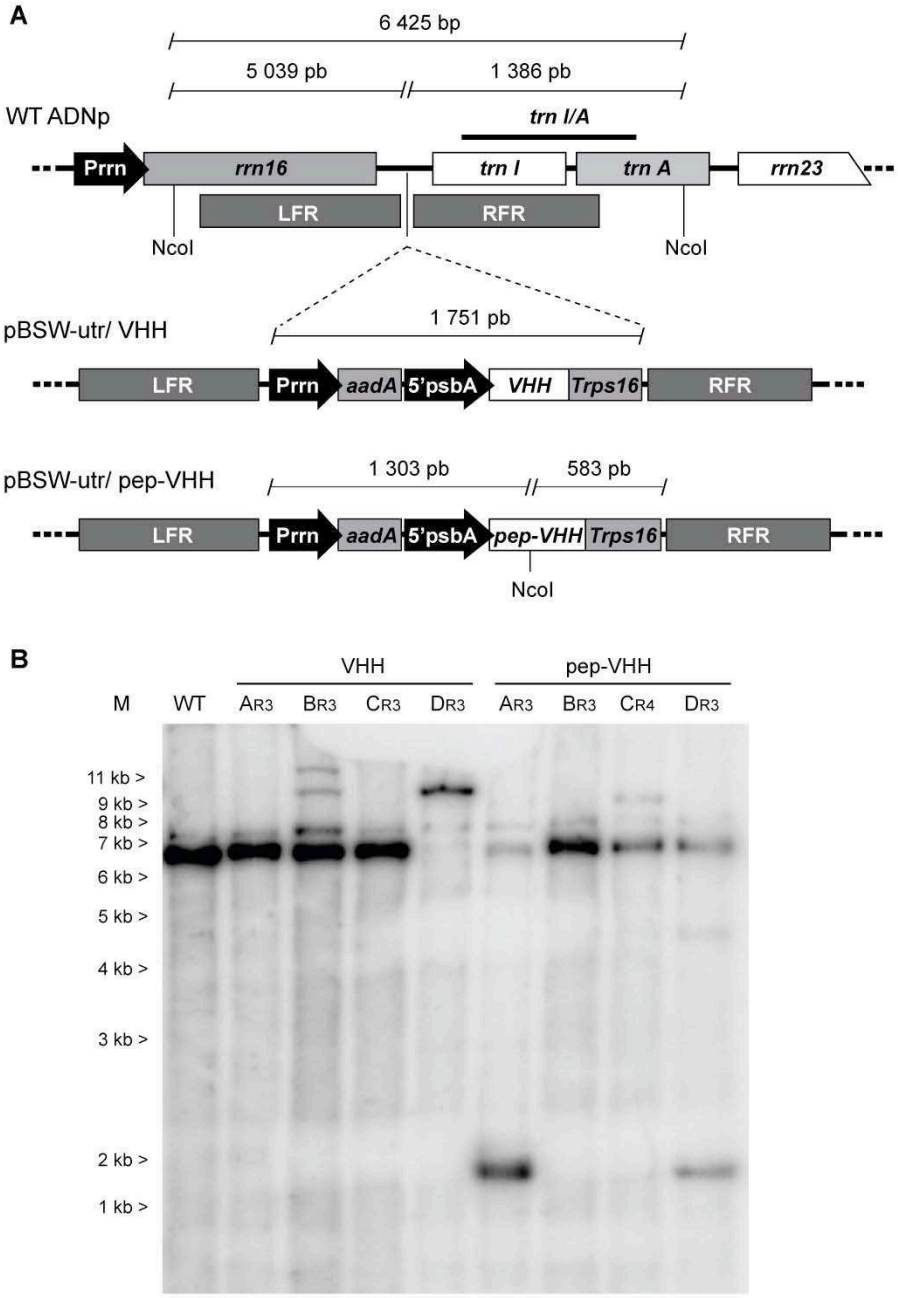

Figura 50. Análisis preliminar por *Southern blot* de plantas transplastómicas con fenotipo heteroplástico VHH y pep-VHH. A) Esquema que muestra la zona de inserción del transgén en el genoma plastídico (WT ADNp). **B)** Análisis de *Southern blot* (gel de agarosa 0,8% [m/v]) de plantas VHH y pep-VHH luego de 3 (R3) ó 4 (R4) rondas de regeneración. Para la hibridación se utilizó la sonda que contiene las secuencias de los genes plastídicos *trn I* y *trn A*. M: 1 kb *DNA Ladder* (PB-L); WT: planta de tabaco *wild-type*.

Se estudió la presencia de la proteína VHH en las plantas transplastómicas heteroplásticas por SDS-PAGE y *western blot*. Entre todas las plantas VHH, solo pudo detectarse la proteína recombinante en la línea A de primera y segunda ronda de regeneración (figura 51A). En plantas de tercera ronda de esa misma línea y las demás líneas analizadas la proteína no pudo ser detectada. En la mayoría de las líneas de plantas pep-VHH analizadas pudo detectarse la proteína recombinante, y en algunos casos su acumulación era lo suficientemente alta como para permitir su visualización directa en un gel teñido con *Coomasie brilliant blue* (figura 51B). La proteína de plantas pep-VHH mostró la misma movilidad electroforética que la producida por la planta VHH, lo cual sugeriría el correcto procesamiento del péptido señal bacteriano por la maquinaria plastídica de translocación y direccionamiento al lúmen de los tilacoides. En algunos casos donde se observó mayor acumulación de la proteína recombinante, se visualizaba una segunda banda de tamaño levemente mayor, que correspondería a VHH conteniendo el péptido de tránsito sin procesar. Llamativamente, en las líneas A y D de plantas pep-VHH la proteína se detectaba en plantas de tercera ronda de regeneración, pero no en las plantas de cuarta ronda. Esto podría deberse a la heteroplastía y a la variación de la expresión en las distintas hojas, lo cual fue posteriormente estudiado. La única planta GUS-E-VHH analizada de modo preliminar por SDS-PAGE y *western blot* mostró una buena acumulación de la proteína de fusión, aunque también la presencia de productos de degradación (figura 51C).

Se analizó la acumulación de la proteína recombinante en distintas hojas de una planta VHH y pep-VHH, que habían sido previamente analizadas por *Southern blot*. En ninguna de las hojas de la planta VHH fue posible detectar la proteína heteróloga (figura 52A), lo cual fue consistente con el *Southern blot* que indicaba la ausencia del transgén (figura 50). La planta pep-VHH analizada mostró un patrón de acumulación muy particular en sus distintas hojas (figura 52B). La expresión más alta se observó en la hoja senescente, era indetectable en una hoja madura, y podía detectarse e incrementaba en las hojas jóvenes, pero estaba ausente en la hoja más joven. Este patrón de acumulación no podría ser explicado por inestabilidad de la proteína, y sería probablemente ocasionado por pérdida de cloroplastos transformados de modo aleatorio en las hojas en ausencia de presión de selección. El análisis de *Southern blot* (figura 50) para esta línea también es consistente con esta hipótesis.

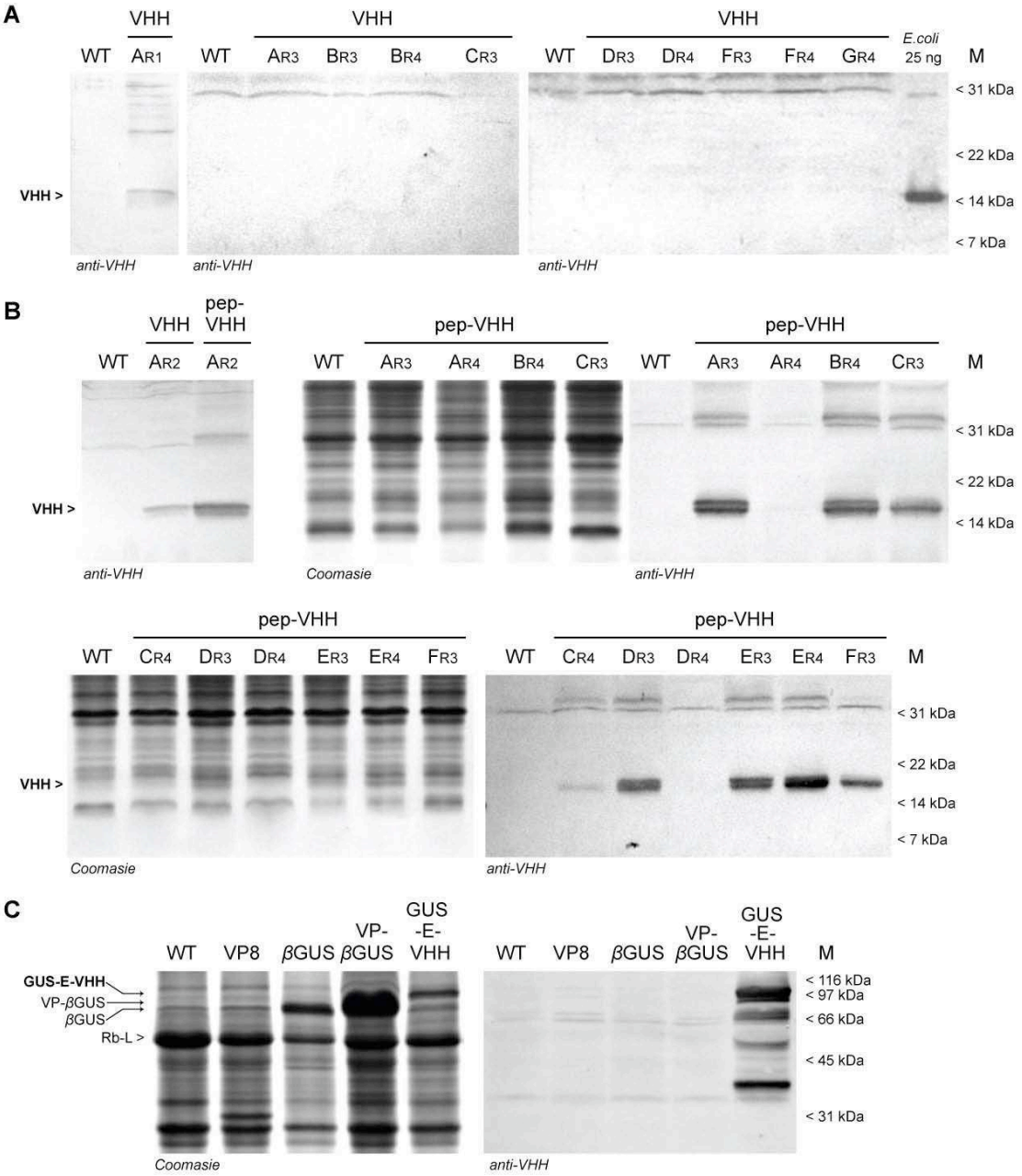

Figura 51. Análisis preliminar por SDS-PAGE y *western blot* de plantas transplastómicas que expresan VHH. A) *Western blot* (gel de poliacrilamida 15% [m/v]) realizado con extractos proteicos de hojas de las líneas de plantas VHH . Se analizaron plantas obtenidas luego de haber pasado por distintos números de rondas de regeneración (R1, R3 y R4). Se incluyeron 25 ng de VHH producida en *E. coli* como control positivo. **B)** SDS-PAGE teñido con *Coomasie Brilliant Blue* y *western blots* (geles 15% [m/v]) para detectar VHH en distintas líneas de plantas pep-VHH. Se incluyó una planta VHH (línea A, R2) para su comparación. **C)** SDS-PAGE teñido con *Coomasie Brilliant Blue* y *western blot* (geles 12,5% [m/v]) para una planta GUS-E-VHH (línea A, R1). Se incluyeron otras plantas transplastómicas para comparación. En todos los casos se sembraron proteínas totales obtenidas a partir de 4 mg de tejido fresco, y la inmunodetección se realizó con un suero de conejo contra VHH. WT: planta de tabaco *wild-type*; Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO; M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD).

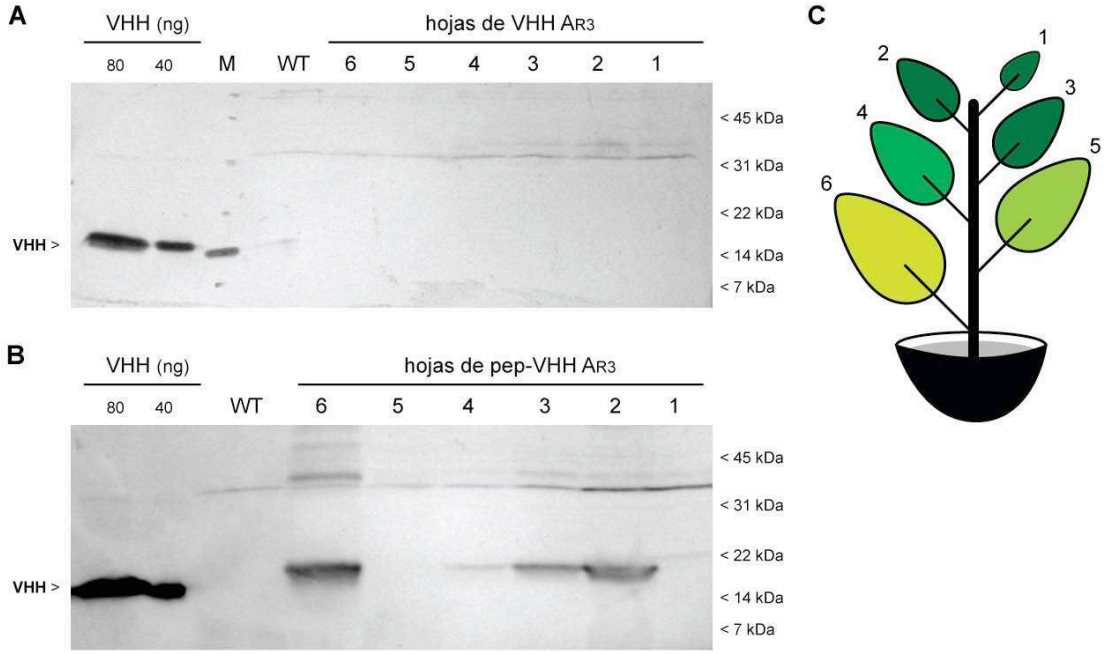

Figura 52. Acumulación de la proteína VHH en distintas hojas de una planta VHH y pep-VHH heteroplástica. A) *Western blot* (gel de poliacrilamida 15% [m/v]) utilizando un suero de conejo contra VHH, para detectar la proteína en las distintas hojas de una planta VHH. **B)** Se repitió el ensayo descripto en "A" para una planta pep-VHH. Se sembraron proteínas totales obtenidas de 4 mg de tejido por calle. Se incluyeron 80 y 40 ng de VHH producida en *E. coli* como control positivo. WT: planta de tabaco *wild-type*; M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (BIO-RAD). **C)** Esquema de las plantas empleadas en el estudio, en donde se representa la hoja senescente con color verde claro (hoja 6).

Fenotipo y caracterización molecular de plantas transplastómicas homoplásticas que expresan VHH.

La gran mayoría de las plantas VHH y pep-VHH, luego de rusticadas y crecidas en invernadero, produjeron semillas incapaces de germinar en presencia de espectinomicina, indicando que sin presión de selección las plantas heteroplásticas tenían una tendencia a perder los cloroplastos con genomas transgénicos. Esta inestabilidad podría deberse a un efecto tóxico de la proteína recombinante en el estroma del cloroplasto; consistentemente, aquellas plantas que dieron semillas capaces de crecer luego en medio selectivo, presentaban un fenotipo clorótico (figura 53). Sólo se lograron obtener semillas que germinaran en presencia de agente selector a partir de dos eventos de las líneas VHH, pep-VHH, y GUS-E-VHH.

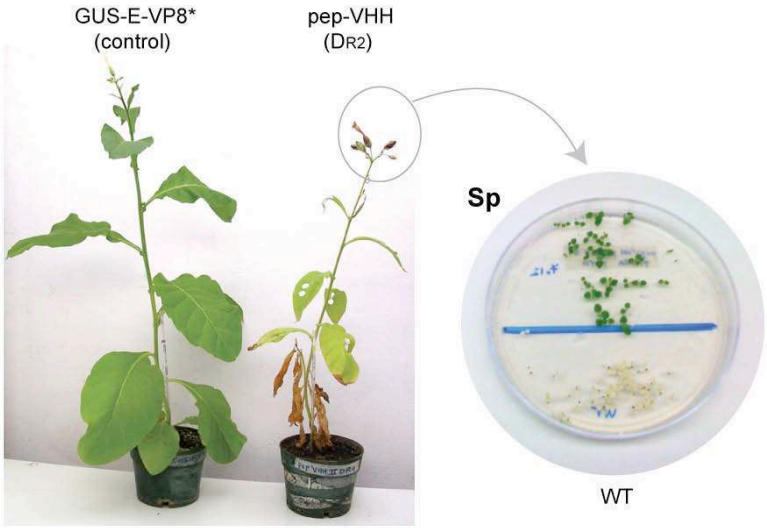

Figura 53. Fenotipo clorótico de una planta transplastómica pep-VHH que produjo semillas conteniendo el transgén. Se incluye una planta transplastómica GUS-E-VP8* crecida en las mismas condiciones para comparación. Se muestra la germinación de sus semillas en medio MS conteniendo espectinomicina (Sp, 500 mg/L), junto a semillas *wild-type* (WT), utilizadas como control del agente selector.

Las plantas obtenidas a partir de semillas germinadas en medio conteniendo espectinomicina no presentaron un fenotipo heteroplástico. Sin embargo, las plantas pep-VHH crecidas *in vitro* mostraban una clorosis que aumentaba en condiciones de mayor intensidad lumínica (figura 54). Este fenómeno también fue observado en plantas rusticadas (figura 55). La línea B de plantas VHH presentó un fenotipo variegado en sus hojas, el cual era independiente de las condiciones de iluminación. La línea D mostró un fenotipo indistinguible del *wild-type*.

Se repitió la caracterización molecular para aquellas líneas de plantas transplastómicas obtenidas a partir de semillas capaces de germinar en presencia del agente selector. Estas líneas fueron positivas para el ensayo de PCR con los oligonuclótidos iniciadores *Cloro fw* y *Cloro rv* (figura 56A y B), y en las plantas GUS-E-VHH también se observó actividad *β*-glucuronidasa (figura 56C). El análisis por *Southern blot* de plantas VHH indicó un estado levemente heteroplástico, y bandas de tamaño mayor al esperado (8,2 kb) para la inserción del transgén en ambas líneas (figura 57B). Las plantas GUS-E-VHH y pep-VHH mostraron el patrón de bandas esperado, con un mínimo de heteroplastía (figuras 57B y 58). Mediante un ensayo de *northern blot* se detectaron los ARN mensajeros conteniendo el transgén con los tamaños esperados para las plantas pep-VHH y GUS-E-VHH (figura 59). En las primeras también se observó la acumulación de productos de degradación. En las plantas VHH los transcriptos tuvieron un tamaño mayor al esperado.

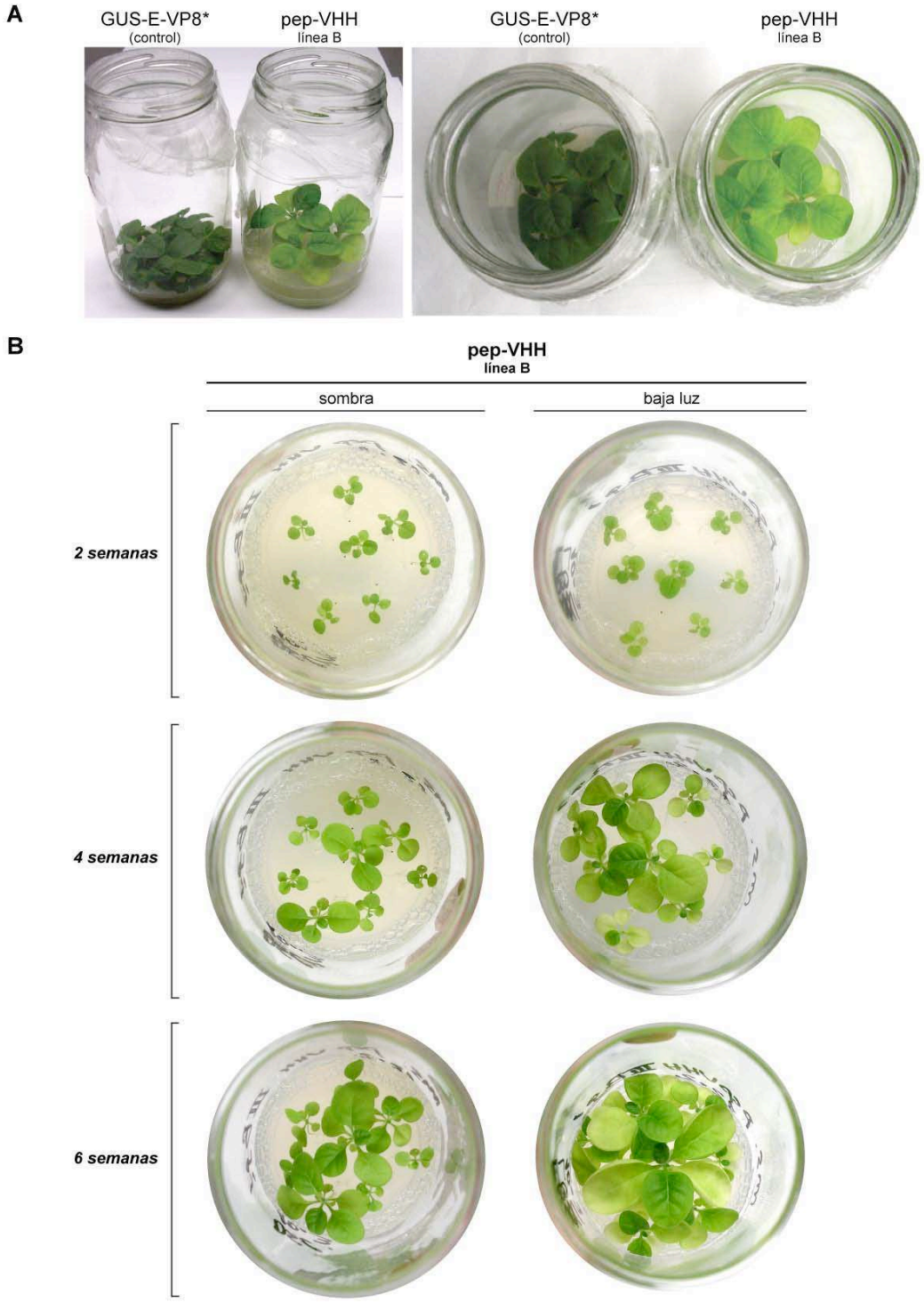

Figura 54. Fenotipo clorótico de una planta transplastómica pep-VHH *in vitro*. A) Plántulas pep-VHH y GUS-E-VP8* provenientes de semillas germinadas en MS en presencia de espectinomicina (500 mg/L). Las fotografías fueron tomadas a las 6 semanas de la germinación. **B)** Plántulas pep-VHH obtenidas como se indica en "A", crecidas en paralelo en condiciones de baja luz (30-100 μmol s^{-1} m^{-2}) y a la sombra (<30 μmol s^{-1} m^{-2}).

Figura 55. Fenotipo clorótico de una planta transplastómica pep-VHH rusticada. Se crecieron por duplicado plantas transplastómicas y *wild-type* (WT) *in vitro* en sombra (<30 μmol s^{-1} m^{-2}) durante 10 semanas, y luego fueron rusticadas. Una plántula de cada línea fue mantenida en invernadero en condiciones normales de luz (derecha, 100-300 μmol s^{-1} m^{-2}), y la otra en sombra (izquierda, <30 μmol s^{-1} m^{-2}). Se muestra el estado de las plantas y un detalle de las hojas al momento de la rusticación y luego de cuatro semanas.

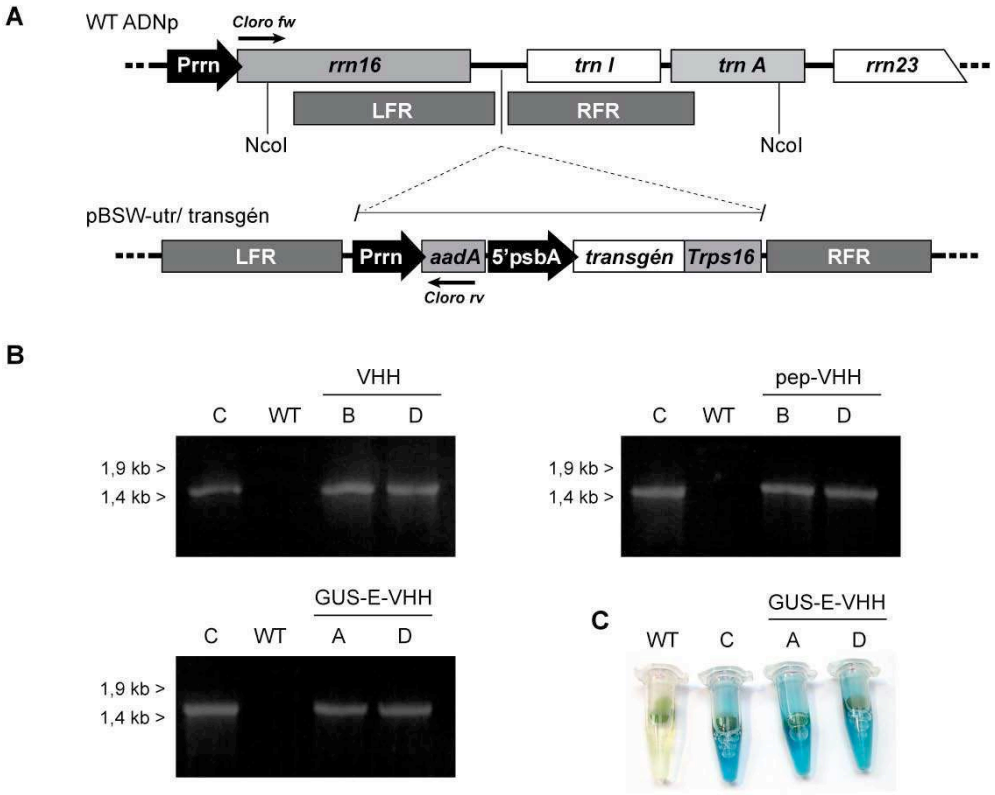

Figura 56. Confirmación de líneas transplastómicas por PCR y actividad *β*-glucuronidasa. A) Esquema del sitio de integración en el genoma plastídico (WT ADNp). Se indica la posición donde hibridan los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la PCR: *Cloro fw* y *Cloro rv*. **B)** PCR con oligonucleótidos iniciadores *Cloro fw* y *Cloro rv*, que permiten amplificar un fragmento de 1.450 pb sólo en las plantas transplastómicas. M: λ BstEII (PB-L). **C)** Ensayo histoquímico para detectar la actividad *β*-glucuronidasa en las plantas GUS-E-VHH. C: planta transplastómica VP-*β*GUS utilizada como control positivo. WT: planta de tabaco *wild-type*.

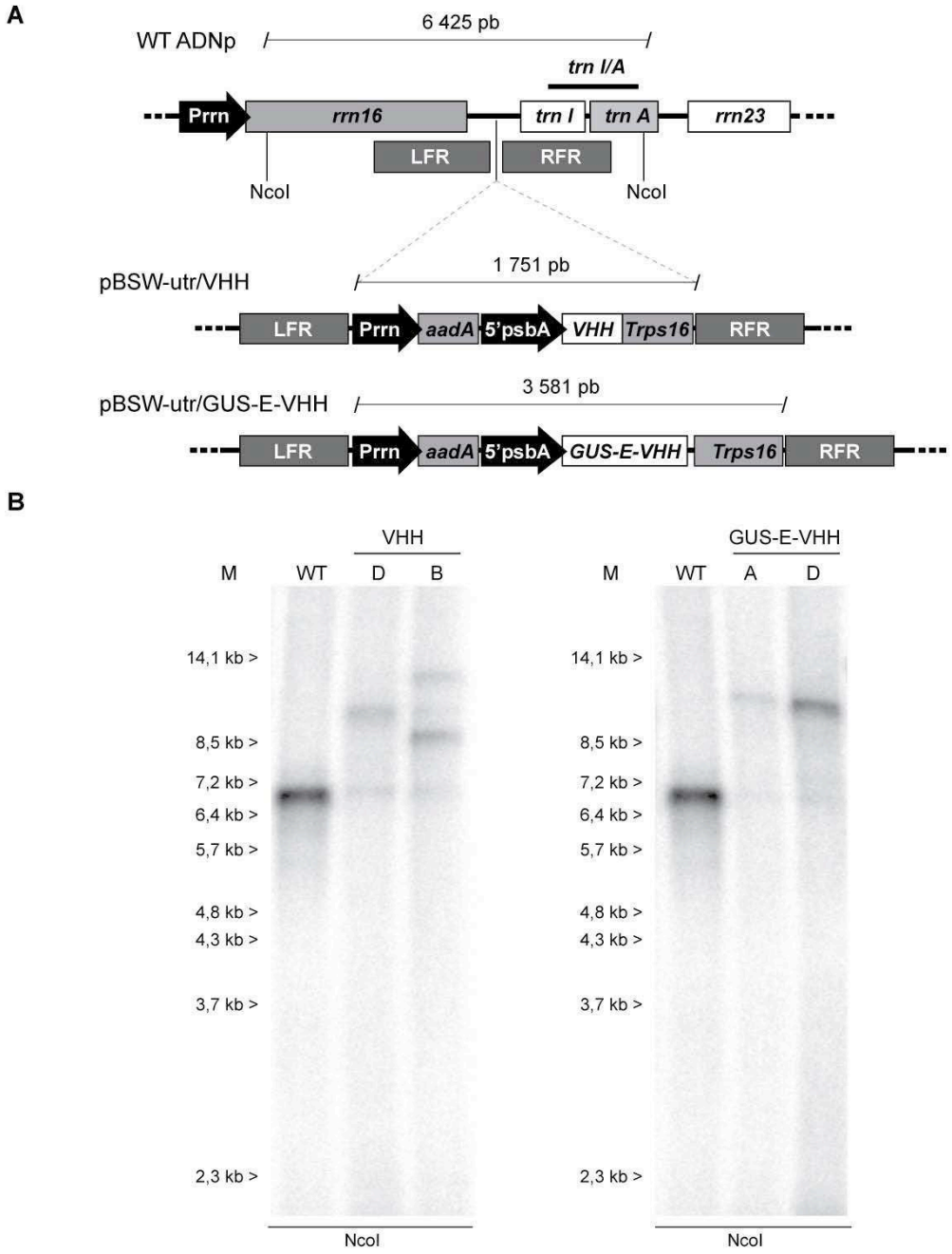

Figura 57. Análisis por *Southern blot* de plantas transplastómicas VHH y GUS-E-VHH. A) Esquema del sitio de integración al genoma plastídico (WT ADNp), donde se indica la posición del sitio de corte de la enzima NcoI utilizada en el ensayo. **B)** *Southern blot* (gel de agarosa 0,8% [m/v]) revelado con la sonda dirigida contra los genes plastídicos *trn I* y *trn A*. M: λ BstEII (PB-L); WT: planta de tabaco *wild-type*.

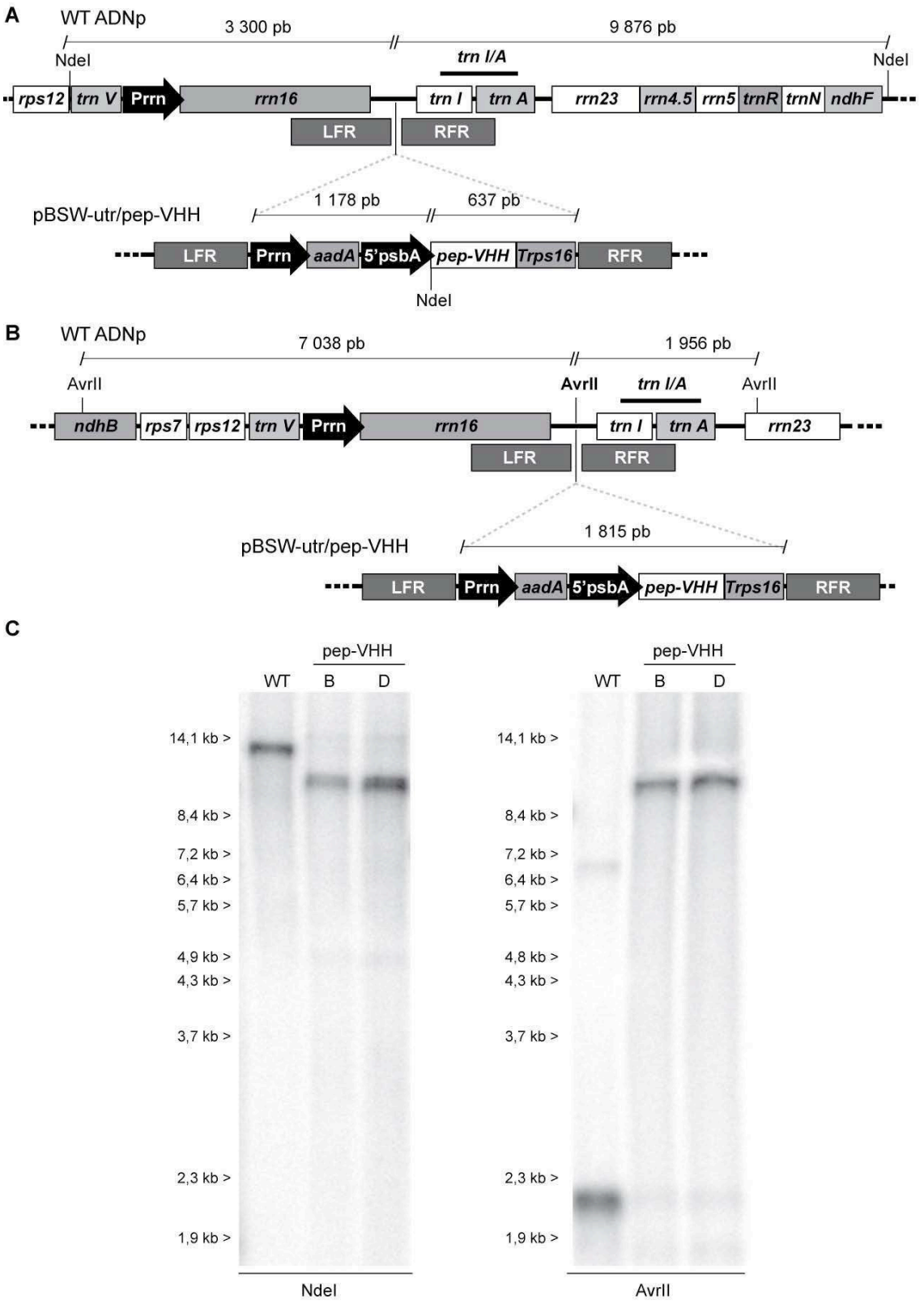

Figura 58. Análisis por *Southern blot* de plantas transplastómicas pep-VHH. A) y **B)** Esquema del sitio de integración al genoma plastídico (WT ADNp), donde se indica la posición del sitio de corte de las enzimas NdeI y AvrII, respectivamente. El sitio AvrII intermedio se pierde en el genoma de la transplastómica pep-VHH. **C)** *Southern blot* (gel de agarosa 0,8% [m/v]) utilizando las enzimas de restricción NdeI o AvrII, revelado con la sonda dirigida contra los genes plastídicos *trn I* y *trn A*. M: λ BstEII (PB-L); WT: planta de tabaco *wild-type*.

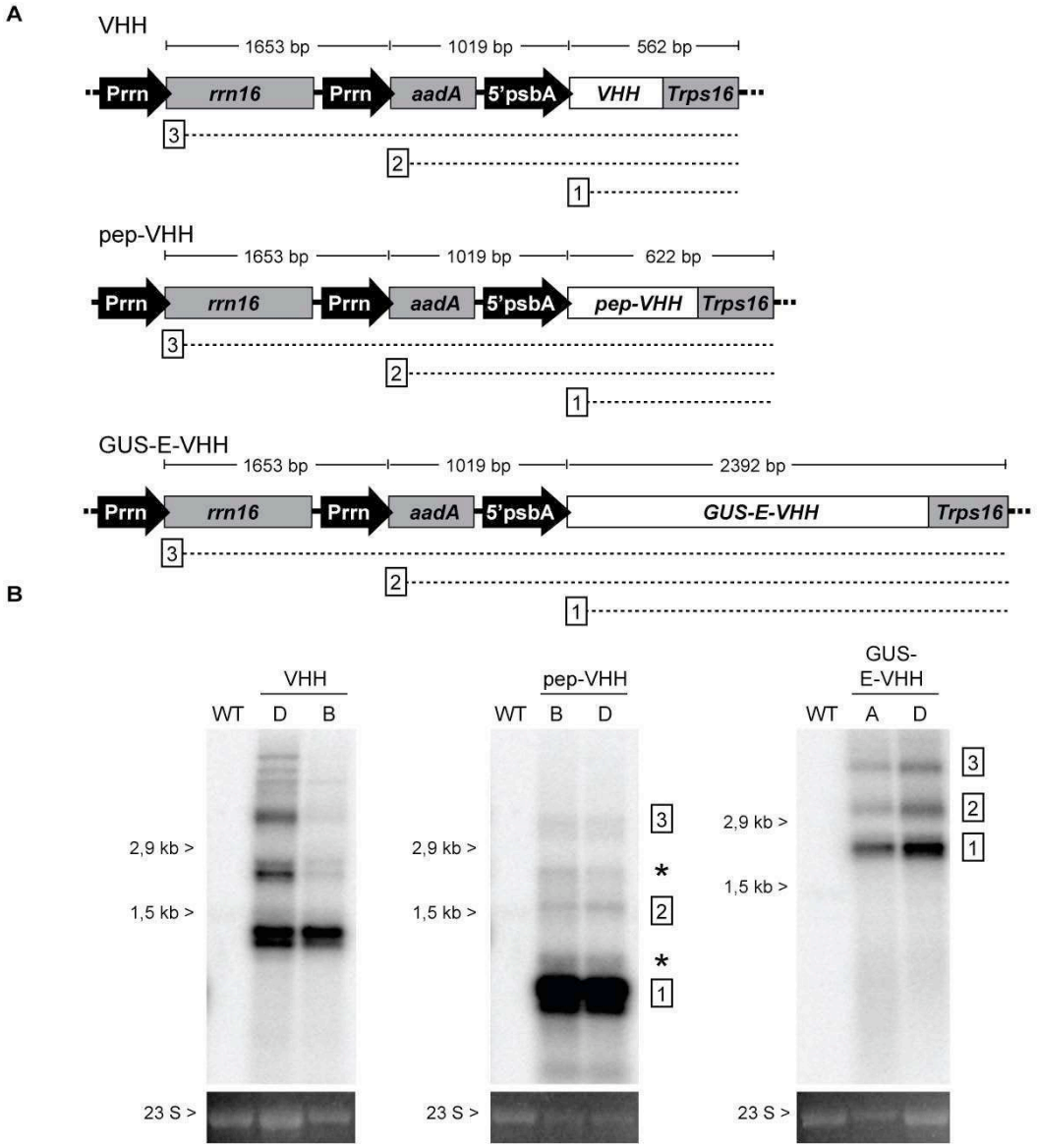

Figura 59. Análisis por *northern blot* de plantas transplastómicas que expresan VHH. A) Mapa de transcripción donde se indican los transcriptos policistrónicos (2 y 3) y el transcripto monocistrónico (1) esperados. **B)** *Northern blot* (gel desnaturalizante de agarosa 1,2% [m/v]) revelado con una sonda dirigida contra el transgén *VHH*. Se indican las posiciones de los ARN ribosomales 23S (2,9 kb) y 16S (1,5 kb) como referencia de tamaño molecular, y la banda correspondiente al 23S en el gel previo a la transferencia, como control de carga. Los transcriptos esperados de acuerdo al mapa de transcripción "A" se señalan con números 1, 2 y 3, y con asterisco los posibles productos de degradación. WT: planta de tabaco *wild-type*.

Mediante un ensayo de *western blot* pudo confirmarse la expresión de la proteína recombinante en las plantas pep-VHH (figura 60); el perfil de proteínas totales observado por SDS-PAGE indicaba una degradación generalizada de proteínas endógenas de la hoja. En las plantas GUS-E-VHH se detectó la proteína de fusión y productos de degradación en altos niveles, lo cual permitió su visualización directa en el gel de poliacrilamida teñido con solución de *Coomasie*. Por el contrario, en las líneas de plantas VHH no fue posible detectar la proteína recombinante. Se estudió la solubilidad de la proteína recombinante en los extractos de

plantas pep-VHH y GUS-E-VHH, y en ambos casos se pudo observar que estas se encontraban mayoritariamente en la fracción soluble (figura 61).

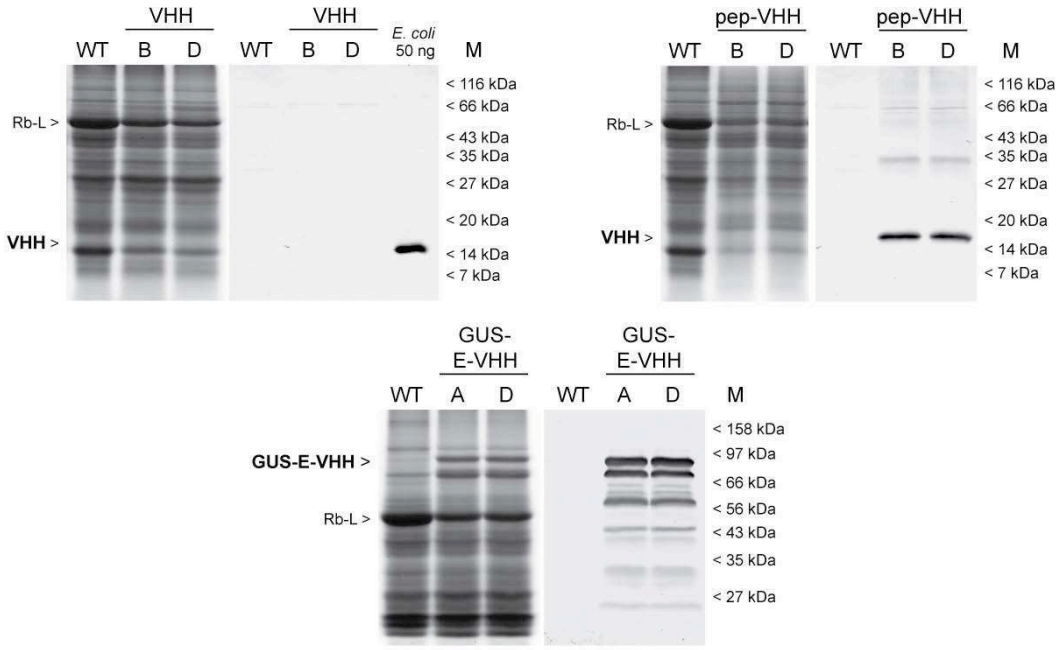

Figura 60. Análisis por SDS-PAGE y *western blot* de plantas transplastómicas que expresan VHH. SDS-PAGE teñido con *Coomasie Brilliant Blue* (izquierda) y *western blot* (derecha) de extractos proteicos de hojas. Se sembraron proteínas totales obtenidas de 4 mg de tejido fresco por calle en geles de poliacrilamida 15% (m/v) para VHH y pep-VHH, y 10% (m/v) para GUS-E-VHH. El *western blot* se reveló con un suero de conejo contra VHH, y se incluyó como control positivo 50 ng de VHH producida en *E. coli*. WT: planta de tabaco *wild-type*; Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO; M: marcadores de peso molecular, *Protein Ladder* (New England Biolabs).

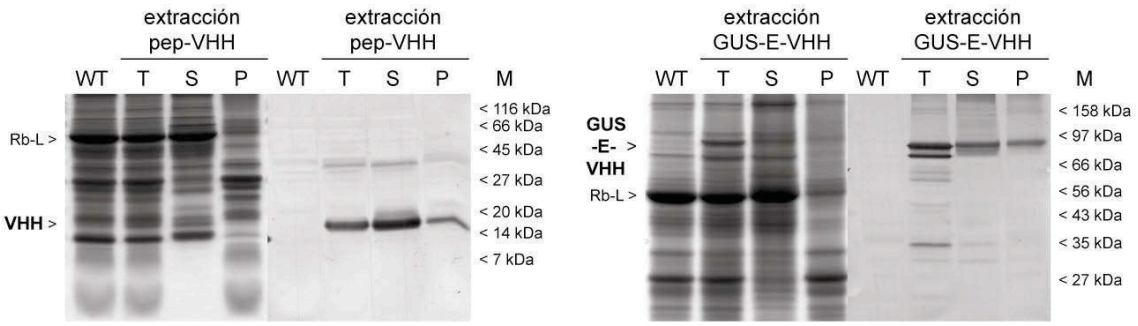

Figura 61. Estudio de la solubilidad de la proteína recombinante en plantas que expresan VHH. Se obtuvieron extractos totales de hoja (T), y de las fracciones solubles (S) e insolubles (P), los cuales fueron analizados por SDS-PAGE teñido con *Coomasie Brilliant Blue* (izquierda) y *western blot* utilizando un suero de conejo contra VHH (derecha). Se sembraron proteínas obtenidas de 4 mg de tejido fresco inicial por calle. Se utilizaron geles 15% (m/v) para pep-VHH y 10% (m/v) para GUS-E-VHH. WT: planta de tabaco *wild-type*; M: marcadores de peso molecular, *Protein Ladder* (New England Biolabs).

Localización subcelular de las proteínas recombinantes.

Para determinar la localización de las proteínas recombinantes GUS-E-VHH y pep-VHH dentro del cloroplasto, se llevó a cabo un protocolo de fraccionamiento subcelular. Se incluyeron en este análisis plantas VP-βGUS, como referencia de plantas transplastómicas que acumulan una proteína recombinante soluble en el estroma del cloroplasto (figura 62). El patrón de distribución de GUS-E-VHH y VP-βGUS fue coincidente: ambas proteínas recombinantes se encontraron mayoritariamente en la fracción estromal. En las plantas pep-VHH se observó la acumulación de la proteína madura VHH en la fracción del lumen de los tilacoides, y en menor proporción la proteína sin procesar en la fracción de membranas. Dado que la señal de direccionamiento es de origen bacteriano, esta podría no ser procesada eficientemente y provocar que parte de la VHH quede retenida en el complejo de translocación de la membrana tilacoidal. A su vez, no se puede descartar la posibilidad de que el VHH 3B2 reconozca un epítope de una proteína en la cara estromal de la membrana de los tilacoides, y de ese modo sea co-purificada con esta fracción. En ambos casos, esto representaría una interferencia para la maquinaria biosintética plastídica, que se pondría de manifiesto en condiciones de mayor iluminación por el aumento de la tasa metabólica.

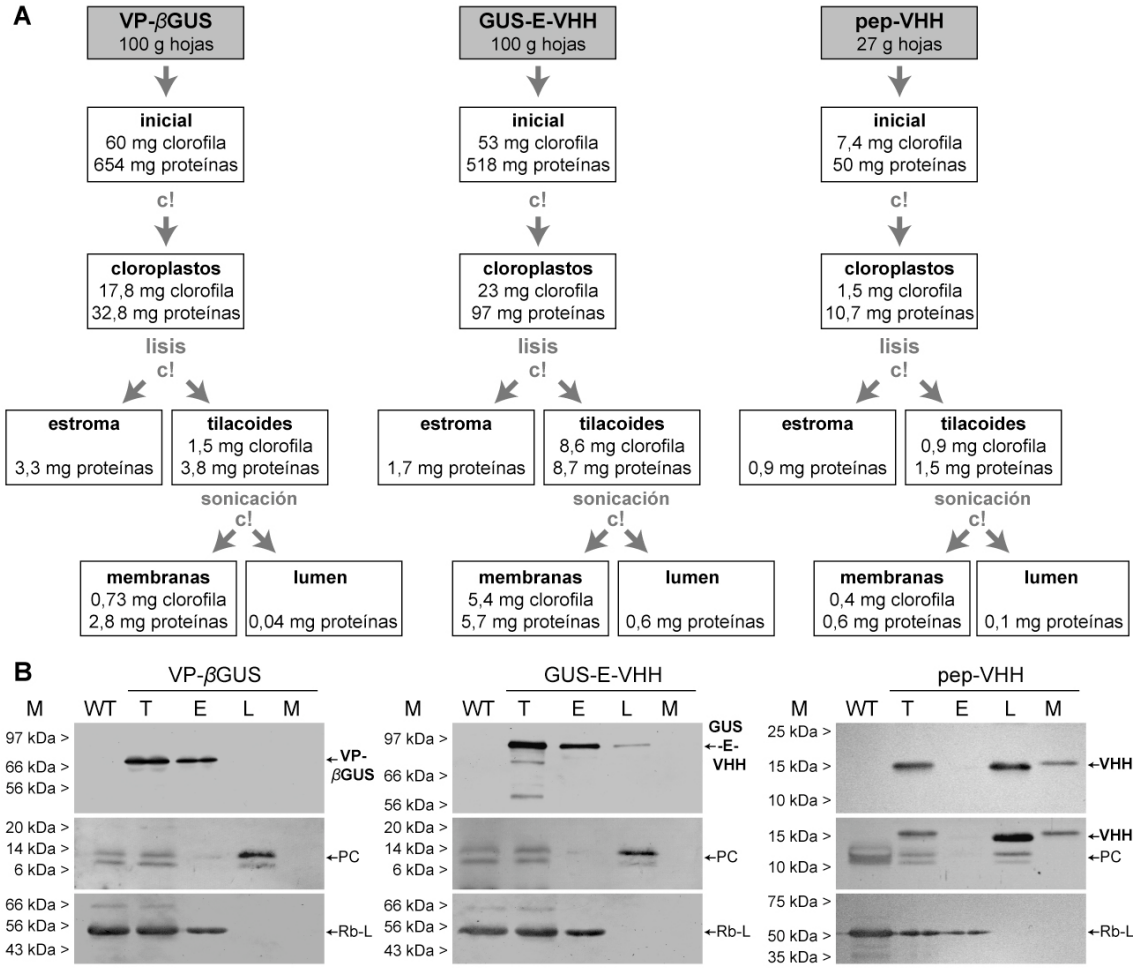

Figura 62. Fraccionamiento subcelular para el estudio de la localización de las proteínas recombinantes en cloroplastos de plantas transplastómicas pep-VHH y GUS-E-VHH. **A)** Esquema general utilizado para obtener fracciones enriquecidas en proteínas de distintos compartimentos del

cloroplasto, y mediciones de proteínas y clorofila total para cada fraccionamiento (c!: centrifugación). **B)** Se sembraron extractos totales de hoja (T), y 10 μg de las fracciones "estroma" (E), "lumen" (L) y "membranas de tilacoides" (M). Panel superior: *western blot* para GUS-E-VHH (gel de poliacrilamida 10% [m/v]), VHH (15% [m/v]), y VP-*β*GUS (10% [m/v]) utilizando un suero de conejo contra VHH y uno de ratón contra el epítope contenido en los aminoácidos 135-160 de VP1 del VFA, respectivamente. Panel intermedio: *western blot* (15% [m/v]) utilizando un suero de conejo contra plastocianina (PC). El suero cruza con la proteína recombinante VHH, y permite la detección conjunta de PC y VHH. Panel inferior: *western blot* (10% [m/v]) utilizando un suero de conejo contra la subunidad mayor de RuBisCO (Rb-L). WT: planta de tabaco *wild-type*; M: marcadores de peso molecular, *Protein Ladder* (New England Biolabs), y *Broad Range* (Promega) para el *western blot* de RuBisCO de la planta pep-VHH.

Estabilidad de la proteína recombinante en las distintas hojas de plantas transplastómicas pep-VHH y GUS-E-VHH.

Se analizó la acumulación de la proteína recombinante en las distintas hojas de las plantas transplastómicas por SDS-PAGE y *western blot*. Según pudo observarse en los geles, la proteína GUS-E-VHH y su principal producto de degradación pudieron detectarse en todas las hojas de la planta transplastómica, incluso en las hojas senescentes (figura 63). Como fue descripto anteriormente, las plantas pep-VHH mostraron un fenotipo clorótico que se vio acentuado en las plantas rusticadas crecidas en condiciones normales de luz. Debido a esto, se estudió la acumulación de la proteína en las distintas hojas de acuerdo a las condiciones de crecimiento de las plantas. La clorosis observada en las hojas de las plantas pep-VHH rusticadas coincidió con un patrón de degradación general de proteínas endógenas de la planta, y la proteína recombinante también fue afectada por esta proteólisis generalizada (figura 64). Cabe remarcar que la hoja más vieja en la cual se detectó la mayor acumulación fue una hoja que había desarrollado completamente *in vitro* antes de que la planta sea rusticada, y dicha hoja fue resguardada en parte de la luz por las hojas superiores.

El fenotipo clorótico y la proteólisis asociada fue menor en una planta crecida en condiciones de baja luz (figura 65). La planta crecida *in vitro* y a la sombra fue la que menor clorosis presentó, y a su vez la que mostró los mejores niveles de acumulación. En este caso los niveles de expresión eran lo suficientemente altos como para permitir la visualización directa del VHH en el gel teñido con *Coomasie*. En todos los casos la proteína recombinante tuvo su acumulación máxima en la hoja más vieja, por lo tanto se podría afirmar que el VHH 3B2 es estable en el lumen de los tilacoides del cloroplasto de tabaco.

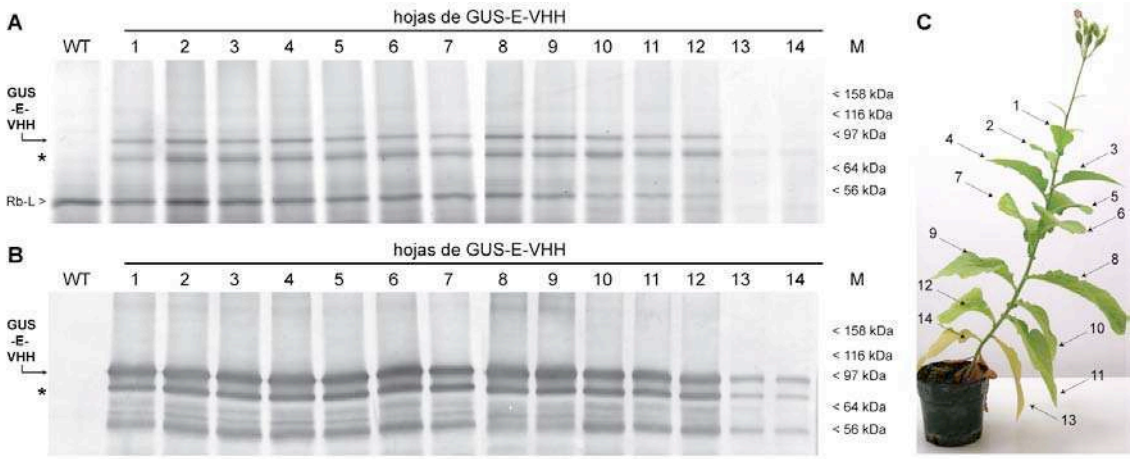

Figura 63. Estabilidad de la proteína recombinante en distintas hojas de una planta GUS-E-VHH. A) Análisis cualitativo por SDS-PAGE (8% [m/v]) de extractos totales de distintas hojas de una planta transplastómica GUS-E-VHH (tinción con *Coomasie brilliant blue*). Se sembraron proteínas totales obtenidas de 4 mg de tejido fresco por calle. Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO. **B)** *Western blot* (gel de poliacrilamida 8% [m/v]) utilizando un suero de conejo contra VHH. El gel fue sembrado del mismo modo que en "A". Se indica la posición de GUS-E-VHH y de su producto de degradación mayoritario (incluído en las cuantificaciones) con un asterisco. M: marcadores de peso molecular, *Protein Ladder* (New England Biolabs). **C)** Planta empleada en el estudio, donde se indican con números las hojas analizadas.

Los resultados obtenidos con las plantas pep-VHH indicaron que tanto la clorosis como la proteólisis se acentuaban en las hojas con mayor exposición a la luz, en aquellas plantas crecidas en condiciones de iluminación normales. Este fenómeno podría deberse a una toxicidad del anticuerpo VHH clon 3B2 cuando este se encuentra en el estroma del cloroplasto, provocando un efecto letal en las plantas VHH, y una toxicidad menor en las plantas pep-VHH. En las plantas pep-VHH la mayor parte de la proteína recombinante es translocada al lumen de los tilacoides, y esto podría disminuir en cierto grado la toxicidad. La mayor exposición a la luz aumentaría los niveles de síntesis de la proteína pep-VHH, debido a que el promotor que dirije su expresión es inducible por luz, como así también la tasa metabólica plastídica (Staub y Maliga, 1993). En estas condiciones podría acumularse el anticuerpo pep-VHH en el estroma, al volverse limitante la capacidad de la maquinaria plastídica para translocar la proteína al lumen de los tilacoides. Es probable que la traslocación sea menos eficiente ya que se utilizó una señal de direccionamiento bacteriana, en lugar de una propia de proteínas plastídicas lumenales.

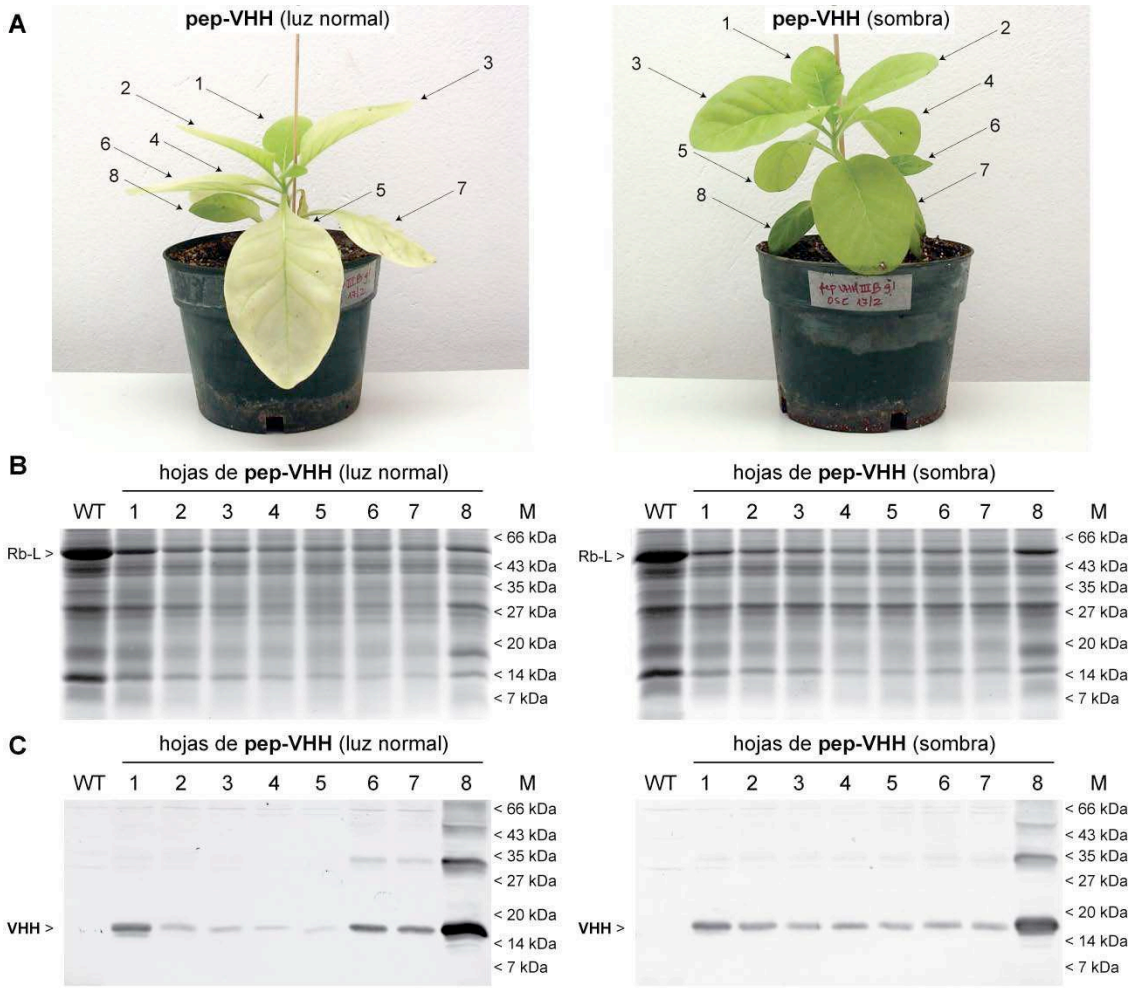

Figura 64. Estabilidad de la proteína recombinante en distintas hojas de una planta pep-VHH crecida en condiciones de luz normal y en sombra. A) Plantas empleadas en el estudio, crecidas en paralelo en condiciones de luz normal (100-300 μmol s^{-1} m^{-2}), y en sombra (<30 μmol s^{-1} m^{-2}). **B)** Análisis cualitativo por SDS-PAGE (15% [m/v]) de las distintas hojas (tinción con *Coomasie brilliant blue*). Se sembraron proteínas totales de 4 mg de tejido fresco por calle. Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO. **C)** *Western blot* utilizando un suero de conejo contra VHH. El gel fue sembrado del mismo modo que en "B". M: marcadores de peso molecular, *Protein Ladder* (New England Biolabs).

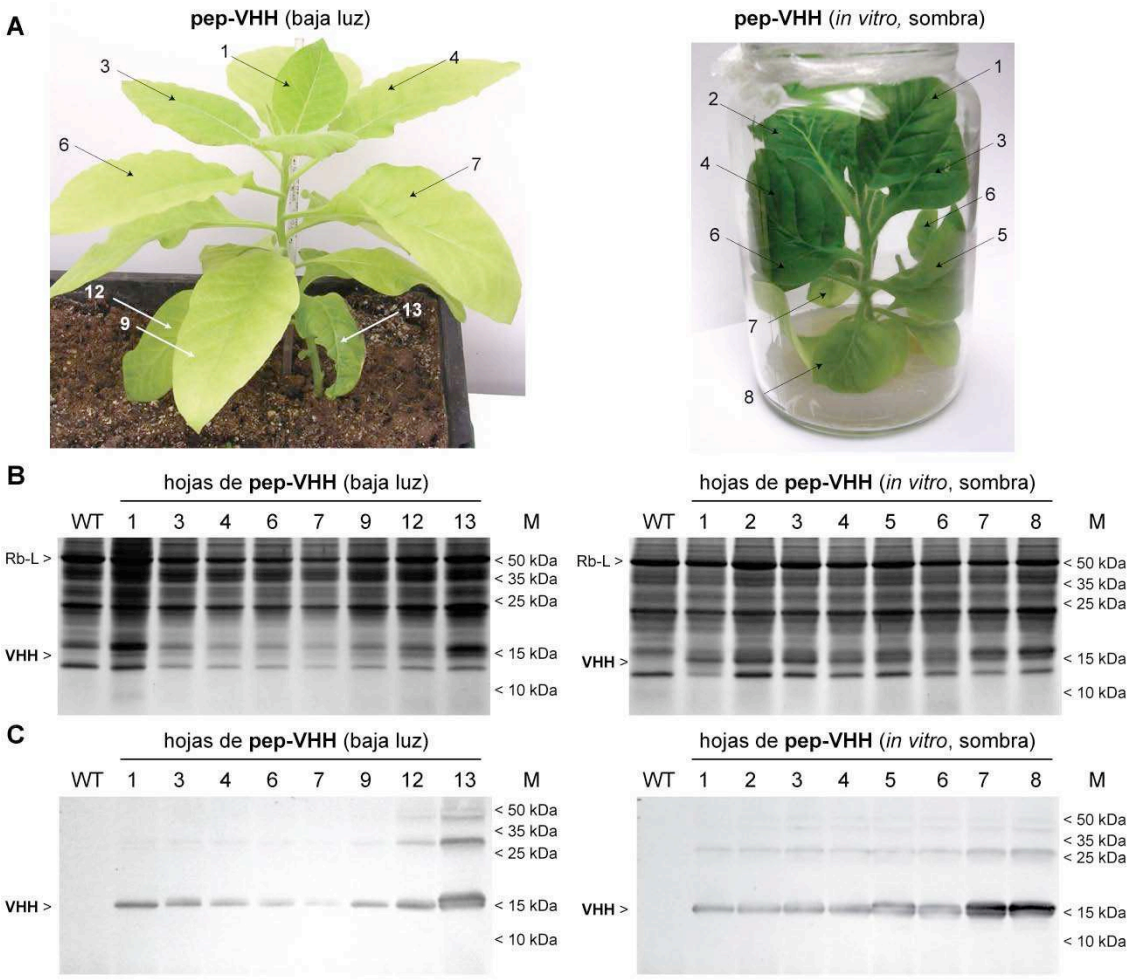

Figura 65. Estabilidad de la proteína recombinante en distintas hojas de una planta pep-VHH crecida con baja intensidad de luz, y en una planta *in vitro* crecida en sombra. A) Plantas empleadas en el estudio. La planta rusticada fue crecida en condiciones de baja luz (30-100 μmol s^{-1} m^{-2}) y la planta *in vitro* en sombra (<30 μmol s^{-1} m^{-2}). **B)** Análisis cualitativo por SDS-PAGE (15% [m/v]) de las distintas hojas (tinción con *Coomasie brilliant blue*). Se sembraron proteínas totales de 4 mg de tejido fresco por calle. Rb-L: subunidad mayor de RuBisCO. **C)** *Western blot* utilizando un suero de conejo contra VHH. El gel fue sembrado del mismo modo que en "B". M: marcadores de peso molecular, *Broad Range* (Promega).

Cuantificación de los niveles de expresión.

Se cuantificó la acumulación de la proteína recombinante en distintas hojas de plantas GUS-E-VHH y pep-VHH. La proteína GUS-E-VHH fue cuantificada por *western blot*, utilizando como estándar la proteína VHH purificada producida en *E. coli* (figura 66). El valor de las cuantificaciones fue la suma de GUS-E-VHH y su principal producto de degradación, ya que al tener este último un tamaño similar, formaba una única banda con la proteína completa en geles de poliacrilamida 15% (m/v). GUS-E-VHH representó aproximadamente el 3% de las PST en las hojas maduras (70 μg/g TF), siendo este el mejor valor registrado entre las diferentes hojas. Estas determinaciones no se corrigieron para incluir la masa de la *β*-glucuronidasa, y esto implicaría una subestimación del valor para el caso de las plantas GUS-

E-VHH. Sin embargo, dado que el interés se centra en la producción del anticuerpo, esta metodología permitió comparar directamente los niveles de expresión de estas plantas con las plantas pep-VHH.

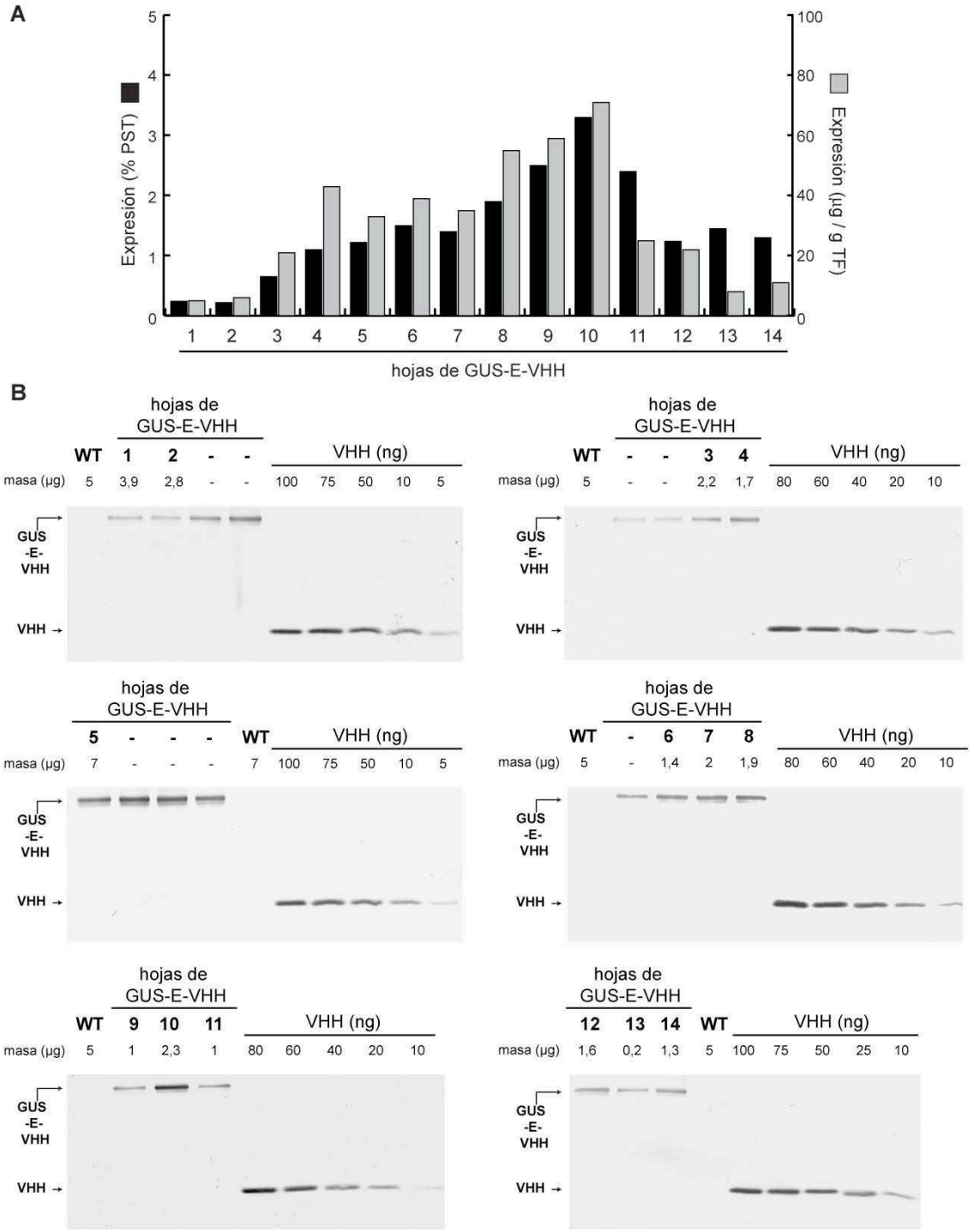

Figura 66. Cuantificación de los niveles de expresión de una planta GUS-E-VHH mediante *western blot*. A) Determinación de la acumulación de GUS-E-VHH en las distintas hojas por densitometría utilizando el programa Image J (NIH, http://rsbweb.nih.gov/ij). Los resultados se expresan como masa de proteína recombinante respecto de la masa de las proteínas solubles totales en el extracto (% PST), y como microgramo de proteína recombinante obtenida por gramo de tejido fresco (µg/g TF). **B)** *Western blots* (geles de poliacrilamida 15% [m/v]) analizados por densitometría para la cuantificación presentada en la parte "A". La inmunodetección se realizó con un suero de conejo contra VHH y se utilizó como

estándar VHH purificada producida en *E. coli*. Solo se tuvieron en cuenta para las determinaciones aquellas calles en las cuales la señal de GUS-E-VHH se encontraba dentro de la curva de calibración realizada con VHH purificado.

Para las plantas pep-VHH rusticadas crecidas en condiciones de luz normal y en sombra, la acumulación máxima se observó en la hoja más vieja, alcanzando aproximadamente el 2% de las PST (≈50 μg/g TF) (figura 67). La proteína recombinante no superaba el 1% de las PST (≈8 μg/g TF, en promedio) en las hojas maduras, y su nivel era casi indetectable en la planta crecida con mayor exposición de luz.

Se observaron en general mejores niveles de acumulación en una planta pep-VHH rusticada que había crecido con baja intensidad de luz, y en una que había crecido *in vitro* y a la sombra (figura 68). Se alcanzaron niveles de entre 2,5 y 3% de las PST (60-90 μg/g TF) en las hojas más viejas, y en la planta rusticada se volvió a observar la disminución de los niveles de VHH en las hojas maduras con mayores signos de clorosis.

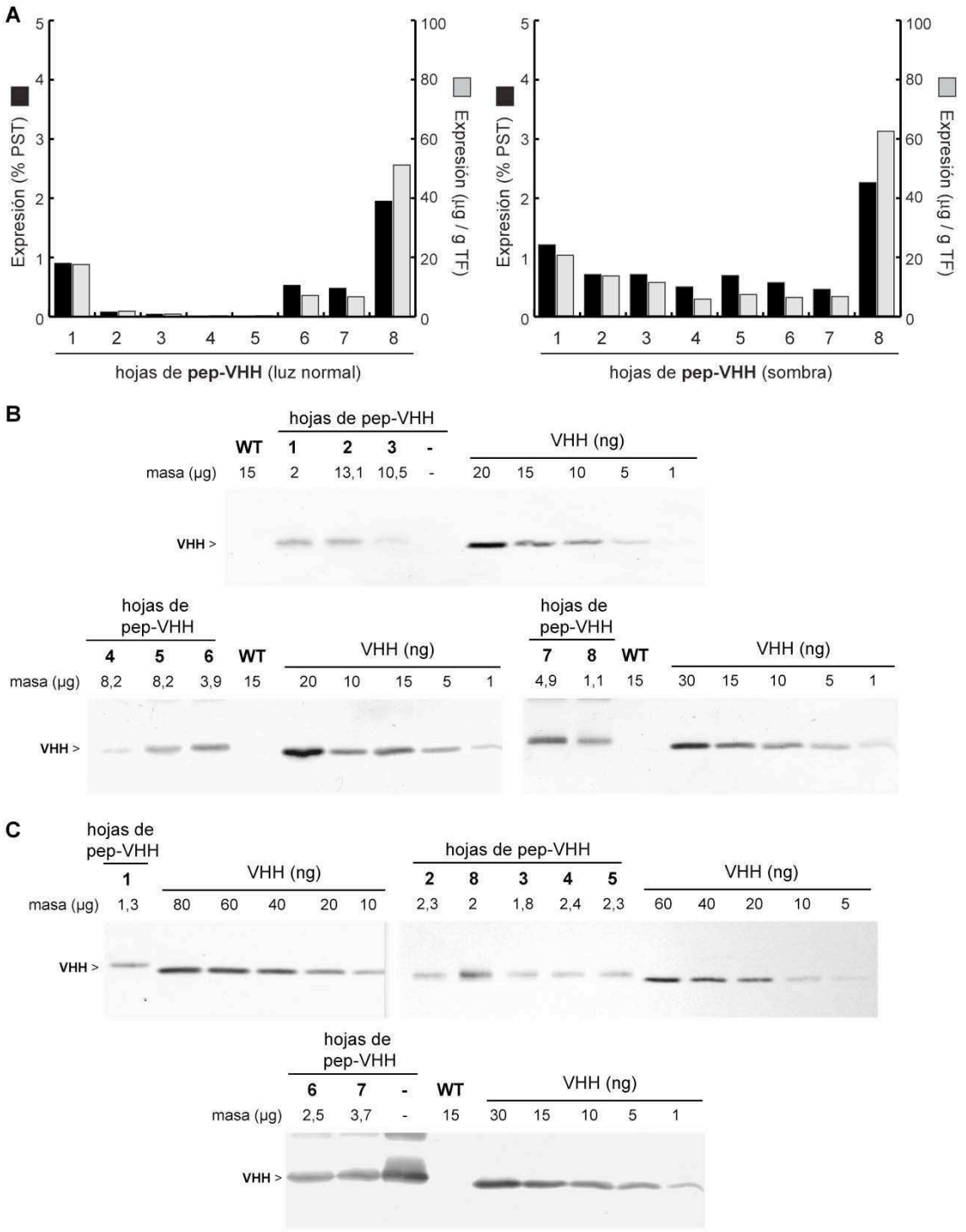

Figura 67. Cuantificación de los niveles de expresión por *western blot* en una planta pep-VHH crecida en condiciones de luz normal y en sombra. A) Determinación de la acumulación de VHH en las distintas hojas por densitometría utilizando el programa Image J (NIH, http://rsbweb.nih.gov/ij). Los resultados se expresan como masa de proteína recombinante respecto de la masa de las proteínas solubles totales en el extracto (% PST), y como microgramo de proteína recombinante obtenida por gramo de tejido fresco (µg/g TF). **B)** y **C)** *Western blots* (geles de poliacrilamida 15% [m/v]) analizados por densitometría para la cuantificación presentada en la parte "A", donde "B" corresponde a las mediciones de la planta crecida en condiciones de luz normal, y "C" a la crecida en sombra. La inmunodetección se realizó con un suero de conejo contra VHH, y se utilizó como estándar VHH purificada producida en *E.*

coli. Sólo se tuvieron en cuenta para las determinaciones aquellas calles en las cuales la señal de VHH se encontraba dentro de la curva de calibración realizada con VHH purificado.

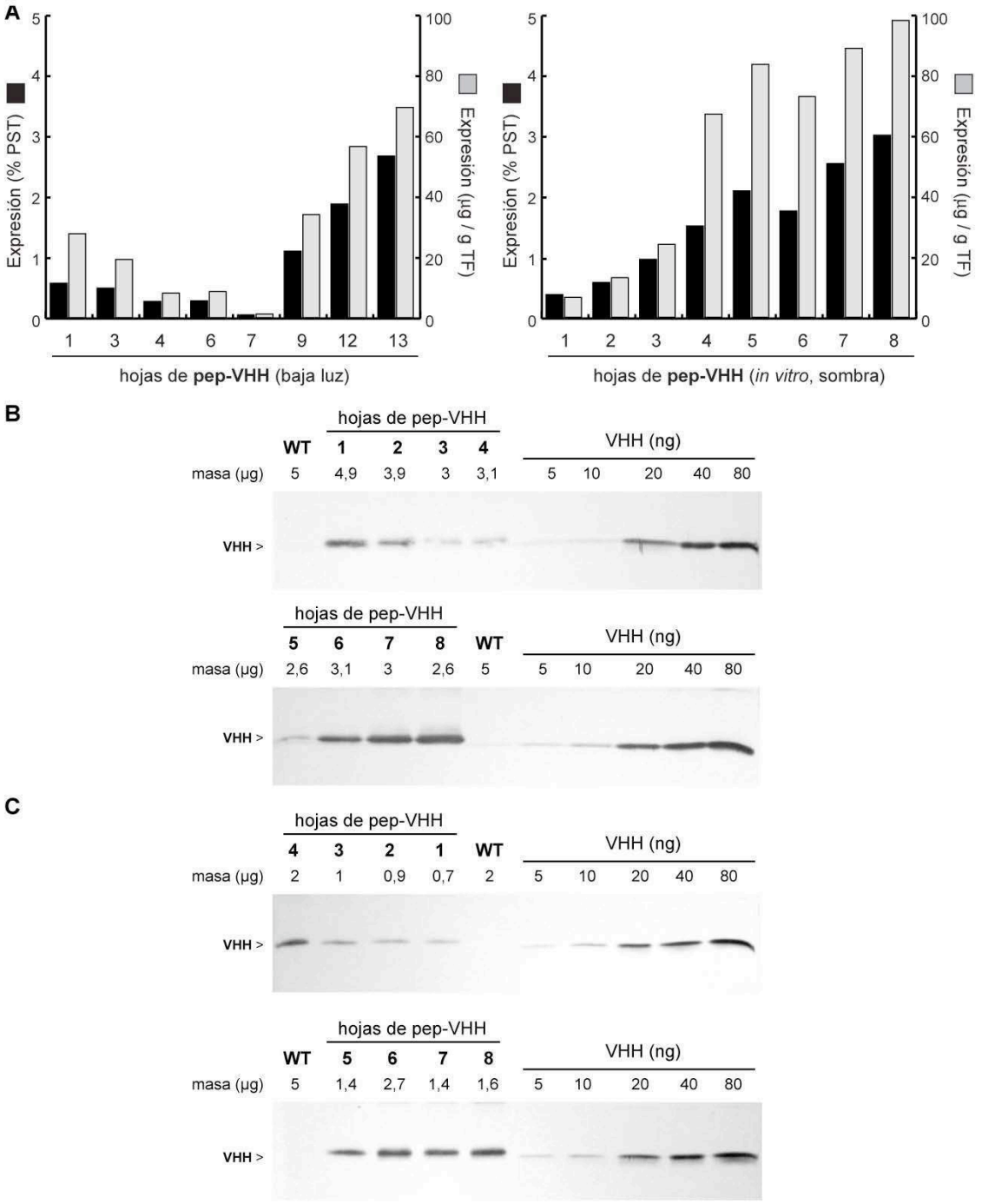

Figura 68. Cuantificación de los niveles de expresión por *western blot* en una planta pep-VHH crecida con baja intensidad de luz, y en una planta *in vitro* crecida en sombra. A) Determinación de la acumulación de VHH en las distintas hojas por densitometría utilizando el programa Image J (NIH, http://rsbweb.nih.gov/ij). Los resultados se expresan como masa de proteína recombinante respecto de la masa de las proteínas solubles totales en el extracto (% PST), y como microgramo de proteína recombinante obtenida por gramo de tejido fresco (µg/g TF). **B)** y **C)** *Western blots* (geles de poliacrilamida 15% [m/v]) analizados por densitometría para la cuantificación presentada en la parte "A", donde "B" corresponde a las mediciones de la planta rusticada crecida en una condición de baja luz, y "C"

a la crecida *in vitro* en sombra. La inmunodetección se realizó con un suero de conejo contra VHH, y se utilizó como estándar VHH purificada producida en *E. coli*.

Tratamiento de la proteína de fusión GUS-E-VHH con enteroquinasa.

En un ensayo preliminar, se intentó separar el anticuerpo VHH de la proteína β-glucuronidasa tratando la fusión GUS-E-VHH con la enzima enteroquinasa. Para este ensayo, se emplearon extractos proteicos totales de hojas de una planta transplastómica GUS-E-VHH, que fueron incubados con cantidades crecientes de la enzima. Se pudo observar que la proteína era clivada por la enteroquinasa, liberando así el anticuerpo VHH con el tamaño molecular esperado (figura 69). Este ensayo permitió determinar que el sitio de reconocimiento por la enzima enteroquinasa incluido en la proteína de fusión era funcional, y que el tratamiento podía realizarse en el extracto crudo, sin necesidad de purificar la proteína.

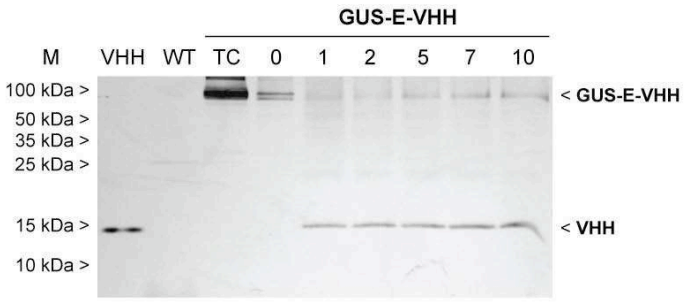

Figura 69. Tratamiento de la proteína de fusión GUS-E-VHH con enteroquinasa. Ensayo preliminar utilizando extractos proteicos totales de hojas de una planta transplastómica GUS-E-VHH, los cuales fueron tratados con cantidades crecientes de una solución de enteroquinasa comercial (1, 2, 5, 7 y 10 μl). Inmunodetección con un suero de conejo contra VHH. WT: extracto total de planta de tabaco *wild-type*; TC: extracto total de planta GUS-E-VHH sin tratar; 0: tratamiento *mock*; VHH: 10 ng de proteína VHH purificada; M: marcadores de peso molecular, *Protein Ladder* (New England Biolabs).

Actualmente se está estudiando la causa de la toxicidad observada en las plantas pep-VHH, y determinando la funcionalidad de las proteínas recombinantes producidas por plantas GUS-E-VHH y pep-VHH.

DISCUSIÓN

Discusión

En esta Tesis Doctoral se expresaron tres proteínas de importancia en medicina veterinaria: dos antígenos virales (VP-βGUS y VP8*), y un nanoanticuerpo de interés para ensayos de diagnóstico y terapias de inmunidad pasiva. A su vez, se evaluaron como estrategias para incrementar los niveles de expresión, el redireccionamiento y la fusión de la proteína de interés a otra de estabilidad conocida. Consistentemente con la experiencia de muchos grupos que trabajan utilizando plantas como biorreactores, observamos que cada proteína dio lugar a fenómenos muy particulares. Esto ilustra la incertidumbre en cuanto a los niveles de expresión que pueden alcanzarse para una proteína recombinante en la célula vegetal, y el desafío único que representa cada una de ellas (Bock y Warzecha, 2010; Rybicki, 2010). Tal es así que las estrategias que no funcionaron para incrementar los niveles de expresión de VP8*, si fueron exitosas en parte para mejorar la acumulación del anticuerpo VHH.

La fusión del epítope p135-160 de VP1 del virus de la fiebre aftosa a la β-glucuronidasa (VP-βGUS) fue una de las primeras proteínas recombinantes que se lograron expresar en altos niveles en el laboratorio. Al momento de obtenerse estos resultados, la Dra. María Eugenia Segretín había logrado obtener altos niveles de expresión para la enzima β-glucuronidasa en hojas de plantas transplastómicas de tabaco y en hojas y tubérculos de *Solanum tuberosum* transplastómicas (Segretin, 2009). Estos resultados permitieron confirmar la utilidad del vector de transformación plastídica pBSW-utr para desarrollar plantas transplastómicas que acumulen proteínas recombinantes en altos niveles. Cuando se comenzó este trabajo ya existían numerosas publicaciones en las que se mostraban ejemplos de plantas transplastómicas con altos niveles de expresión (De Cosa y col., 2001; Tregoning y col., 2003). Sin embargo, en las plantas transplastómicas producidas en el laboratorio para expresar distintas proteínas y antígenos no se habían observado niveles de expresión importantes (Wirth, 2005; Morgenfeld y col., 2009). Es por esto que los resultados obtenidos en este trabajo contribuyeron a demostrar la utilidad del vector pBSW-utr diseñado en nuestro laboratorio. Cabe remarcar que el vector de transformación plastídico pBSW-utr presenta características que han sido identificadas en distintos trabajos como claves para alcanzar altos niveles de expresión. El promotor y la región 5' no traducida del gen *psbA* promueve una alta tasa de transcripción inducible por luz (Bruick y Mayfield, 1999), y confiere estabilidad y traducibilidad a los mensajeros (Staub y Maliga, 1994). Los sitios de recombinación utilizados dirigen la inserción del transgén en la zona duplicada del genoma plastídico, lo cual está asociado con mejores niveles de expresión (Herz y col., 2005). Otra característica interesante es que el sitio NdeI utilizado para el subclonado de los genes a ser expresados permitiría el fenómeno de *extended base pairing*, ya que agrega a los ARNm transcriptos una U en la posición -1 respecto del AUG inicial. De este modo, el anticodón presente en el ARNt-formilmetionina puede aparearse no sólo con las tres bases del codón AUG, sino también con la base U anterior. El *extended base pairing* ha sido relacionado con una mejora adicional de la traducción respecto del efecto de la región 5' no traducida y el *downstream box* (Esposito y col., 2001; Esposito y col., 2003).

Los niveles de expresión de VP-βGUS se mejoraron aproximadamente 500 veces respecto de lo alcanzado en la planta de alfalfa transgénica nuclear con mayor expresión para el mismo antígeno (Dus Santos y col., 2002), y se conservó su inmunogenicidad. El nivel de expresión fue 51% de las PST en una hoja madura (≈8 mg/g TF), y esto no afectó el desarrollo ya que fenotípicamente eran indistinguibles de las plantas control no transformadas. Niveles aún mayores de expresión en plantas transplastómicas fueron correlacionados con un fenotipo de crecimiento retardado y clorótico, atribuido al agotamiento de la capacidad biosintética de las plantas. Sin embargo, no está descartado que el fenotipo sea consecuencia de un efecto deletéreo de la proteína expresada (Oey y col., 2009). Se ha demostrado posteriormente que es posible alcanzar altos niveles de expresión sin afectar el fenotipo de las plantas transplastómicas (Bally y col., 2009), lo cual es importante para la obtención de biomasa suficiente en tiempo y forma antes del proceso *downstream*.

La acumulación de VP-βGUS parecería ser aún mayor que la de la enzima β-glucuronidasa sola. Los ensayos fluorométricos indicaron actividades enzimáticas similares en plantas VP-βGUS y βGUS, sin embargo no se puede descartar una modificación de la funcionalidad de la enzima al tener fusionado a su extremo N-terminal el péptido correspondiente a VP1 de VFA. La visualización directa en geles de poliacrilamida teñidos con *Coomasie Brilliant Blue* mostró en repetidas ocasiones niveles mayores de VP-βGUS respecto de βGUS. Considerando que los análisis de *northern blot* mostraron que ambos transgenes se transcriben de manera similar y que en cloroplastos la regulación de la expresión ocurre principalmente a nivel post-transcripcional (Deng y Gruissem, 1987), se podría considerar que la diferencia en los niveles de expresión se debería a una mejora en la traducción, la estabilidad de la proteína, o un efecto combinado de ambos factores. Los estudios de Giglione y colaboradores (2003) mostraron que la secuencia aminoacídica N-terminal de las proteínas plastídicas influye en su vida media. Recientemente, el grupo dirigido por el Dr. Bock confirmó esta hipótesis mediante un estudio detallado y sistemático con plantas transplastómicas (Apel y col., 2010). Según este trabajo, la arginina siguiente a la metionina inicial de VP-βGUS podría hacer más estable a la proteína cuando se la compara con βGUS, la cual posee una leucina en lugar de arginina. Sin embargo, no se pueden descartar otros factores que favorezcan su acumulación y que puedan estar presentes en la secuencia que codifica para los 23 aminoácidos adicionales contenidos en el péptido p135-160 de VP1.

En trabajos realizados por distintos grupos se ha identificado una región río abajo del codón de inicio en genes plastídicos que favorece de modo importante la acumulación de proteínas recombinantes. Esta secuencia llamada *downstream box*, favorecería la traducción de los mensajeros (Kuroda y Maliga, 2001a,b), y su utilidad ha sido demostrada en varios estudios (Ye y col., 2001; Herz y col., 2005). Sería interesante analizar la capacidad de este péptido p135-160 para incrementar los niveles de expresión de otras proteínas recombinantes en cloroplastos, de modo similar a como ha sido demostrado para secuencias identificadas como *downstream box*.

La segunda proteína expresada en este trabajo fue el antígeno VP8* de rotavirus bovino. Al igual que la VP8* obtenida mediante expresión transitoria utilizando un vector viral (Mozgovoj y col., 2004b), la producida en plantas transplastómicas fue inmunogénica y protectiva. A su vez, el rendimiento de antígeno por gramo de tejido fresco fue 100 veces mayor respecto del obtenido con el vector viral, y 80.000 veces mayor al de las plantas de alfalfa transgénicas que expresaban VP8* (Mozgovoj, 2008). Una particularidad que presentó VP8* al ser expresada en el estroma de plantas transplastómicas, fue la formación de agregados insolubles que pudieron ser parcialmente solubilizados por sonicación. Esta proteína cuando es expresada en el citoplasma de *E. coli* forma dímeros y cuerpos de inclusión, a partir de los cuales puede extraerse y renaturalizarse para ser luego utilizada en ensayos de inmunización y desafío con el virus (Lee y col., 1998; Bellido y col., 2009). Es conocido que los cloroplastos tienen la capacidad de formar cuerpos de inclusión, ya sea naturalmente por el incorrecto ensamblado de proteínas endógenas (Ketchner y col., 1995) o artificialmente por la presencia de proteínas recombinantes (De Cosa y col., 2001; Fernández-San Millán y col., 2003). Actualmente se están realizando microscopías electrónicas para visualizar los potenciales cuerpos de inclusión en los cloroplastos de las plantas transplastómicas VP8*.

La insolubilidad de VP8* permitió su preparación para la inoculación de ratones mediante un protocolo sencillo, obteniéndose la proteína recombinante tanto en la fracción soluble como en la insoluble. La fracción insoluble final resultante de este protocolo se encontraba altamente enriquecida en VP8*, y fue inmunogénica y protectiva en el modelo del ratón lactante al igual que la fracción soluble. Cabe resaltar que la fracción insoluble no contenía nicotina. Las plantas en general como biorreactores tienen la ventaja de carecer de toxinas microbianas y animales y secuencia de ADN oncogénicas (Miele, 1997), sin embargo el tabaco tiene la desventaja de contener alcaloides, y esto en parte fue la motivación para la puesta a punto del *molecular farming* en especies vegetales comestibles. Mediante esta simple metodología de extracción a partir de tejido vegetal donde la proteína de interés se encuentra formando agregados insolubles, se obtiene un producto libre de nicotina y probablemente también carente de otros alcaloides. Se considera como regla general que la purificación de proteínas recombinantes a partir de plantas transgénicas es un paso potencialmente más costoso en comparación con los sistemas clásicos de producción utilizando microorganismos o líneas celulares (Daniell y col., 2001; Giddings, 2001). Debido a esta razón sería interesante repetir estos estudios para otro antígeno que forme agregados insolubles y determinar si es posible obtenerse también en este caso una fracción insoluble enriquecida en el mismo, libre de nicotina y que mantenga su capacidad inmunogénica. Es importante tener en cuenta que las plantas de tabaco modificadas genéticamente utilizadas como sistema de producción, no presentan el riesgo de introducirse accidentalmente en la cadena alimenticia. Por esta razón hay un renovado interés en el uso de esta especie, como plataforma de producción de proteínas recombinantes por parte de la industria (Davies, 2010).

Para el antígeno VP8*, las dos estrategias alternativas de expresión utilizadas en este trabajo no mostraron mejoras en los niveles de expresión, de hecho, fueron contraproducentes. La fusión de VP8* a la β-glucuronidasa aumentó tanto su solubilidad como inestabilidad, de modo

que la proteína de fusión solo pudo ser detectada en las hojas más jóvenes, al igual que lo observado para VP6 del mismo virus en plantas transplastómicas (Birch-Machin y col., 2004). La enzima β-glucuronidasa se acumula en altos niveles y es sumamente estable en el estroma, y VP8* es también altamente estable incluso en las hojas senescentes, sin embargo se encuentra formando agregados insolubles, siendo este tal vez el motivo de su mayor estabilidad. La fusión a la β-glucuronidasa estaría de algún modo evitando la agregación y haría que VP8* sea susceptible al ataque por proteasas que se encuentran presentes en el estroma de los cloroplastos.

El redireccionamiento de VP8* al lúmen de los tilacoides produjo un procesamiento no esperado de la proteína, acumulándose una forma truncada de la misma. La señal bipartita utilizada para direccionamiento se procesaría correctamente según el patrón de bandas observado en los ensayos de *western blot*. Sin embargo, se detectó la acumulación de una forma adicional de VP8* de localización lumenal, que resultaría de una actividad proteolítica residente en este compartimento. La proteína VP8* al ser translocada al lumen de los tilacoides se encontraría en una forma soluble y accesible a la acción de proteasas allí presentes (Chasin y col., 2002), a diferencia de lo que ocurre en el estroma donde la formación de cuerpos de inclusión la protegería de la proteólisis. Dado que el direccionamiento de VP8* ocurre desde el estroma y no desde el citoplasma, porque en este caso la proteína es codificada por el genoma plastídico, la primera parte de la secuencia bipartita no sería necesaria. A pesar de esto, este primer segmento del péptido señal en VP8* no interferiría para la translocación de estroma a lúmen de los tilacoides, y sería removido eficientemente por la peptidasa del estroma según los resultados obtenidos. Se ha demostrado que el péptido señal de la ferredoxina permite el clivaje *in vivo* de una proteína de fusión dentro del estroma de *Chlamydomonas reinhardtti* transplastómica (Muto y col., 2009). Entonces, sería esperable que la primer parte de la secuencia pudiera ser procesada por la peptidasa estromal a pesar de no haber atravesado la membrana interna del cloroplasto. En *E. coli*, la señal de direccionamiento a tilacoides de la proteína de tabaco OE23 también provocó la acumulación de una forma de VP8* truncada. Esto sugeriría que la secuencia de tabaco es reconocida por la maquinaria bacteriana de translocación a periplasma.

El nivel de expresión de las plantas transplastómicas VP8* y su estabilidad son compatibles con su utilización para la producción masiva de este antígeno vacunal. La eventual producción de una vacuna para el ganado bovino requeriría una combinación de plantas expresando VP8* de las 3 cepas circulantes (Garaicoechea y col., 2006). Esta tarea se considera factible según los datos obtenidos en esta Tesis para una de esas tres variantes de VP8*.

La tercera molécula expresada fue un nanoanticuerpo de camélido (VHH) que no había sido expresado anteriormente en sistemas vegetales. Las plantas transplastómicas producidas que expresan el VHH clon 3B2 en el estroma presentaron niveles casi indectables de la proteína y el transgén mostró una gran inestabilidad, perdiéndose en las sucesivas rondas de regeneración y selección. Los resultados de los ensayos de *Southern blot* y *northern blot*

indicaron la presencia de rearreglos en el plastoma y de transcriptos aberrantes, respectivamente. Las sucesivas rondas de regeneración de estas plantas llevaron a la selección de eventos transplastómicos con rearreglos en los que no ocurría síntesis de la proteína. Las dificultades experimentadas para desarrollar las plantas transplastómicas VHH ponen de manifiesto un efecto deletéreo de esta molécula en el estroma del cloroplasto: baja eficiencia de transformación, la obtención de escapes, fenotipo y genotipo heteroplástico, inestabilidad del transgén y pérdida del mismo en semillas.

Para el VHH utilizado en este trabajo, las dos estrategias alternativas empleadas mejoraron la acumulación de la proteína recombinante. La generación de las plantas transplastómicas pep-VHH también presentó algunas de las dificultades mencionadas anteriormente para las plantas VHH: fenotipo y genotipo heteroplástico y pérdida del transgén en las semillas. En estas plantas no fue posible alcanzar la homoplastía mediante sucesivas rondas de regeneración y selección en presencia de antibiótico. Sin embargo, las semillas obtenidas de algunas de estas plantas fueron capaces de germinar en presencia del agente selector, mostrando la posibilidad de alcanzar la homoplastía por esta vía, lo cual fue confirmado por *Southern blot*. En *Nicotiana tabacum* y numerosas especies vegetales, el genoma plastídico es de herencia materna y son solo algunas copias del mismo las que pasan a través de un evento estocástico a la próxima generación (Daniell y col., 2002). Por esta razón, si las semillas obtenidas son capaces de germinar en presencia de agente selector, es altamente probable que las plantas resultantes sean homoplásticas. Consistentemente, en las plantas pep-VHH obtenidas a partir de semillas germinadas en presencia de espectinomicina, la expresión de la proteína y su efecto tóxico se pusieron de manifiesto de una forma muy clara, tanto *in vitro* como en las plantas rusticadas crecidas en invernadero. En condiciones normales de iluminación, las plantas pep-VHH experimentaban una clorosis creciente y un retardo en el desarrollo. La acumulación de la proteína recombinante se veía afectada fuertemente por el estado de la hoja, siendo menor en las hojas cloróticas posiblemente por ser degradada por proteasas al igual que el resto de las proteínas endógenas. En las distintas cuantificaciones realizadas, siempre se observaron los mejores niveles de proteína recombinante en la hoja de mayor edad, indicando una gran estabilidad de la proteína VHH en lúmen en los casos en que la hoja no presentara clorosis. En este caso, el máximo nivel de expresión estaría determinado por efectos citotóxicos del transgén y no por el costo energético adicional que implica la síntesis de la proteína heteróloga (Davies, 2010). Los niveles de expresión (2,5% de las PST; 60 μg/g TF) y la solubilidad de VHH alcanzada en plantas pep-VHH son compatibles con una producción a gran escala, si las plantas tuviesen un desarrollo normal en tierra, ya que este factor es fundamental para poder obtener biomasa suficiente (Davies, 2005; Sheludko y col., 2007). La comparación de la proteína obtenida en las plantas VHH y pep-VHH indicó el correcto procesamiento del péptido señal bacteriano, y el fraccionamiento subcelular confirmó la translocación de la proteína al lúmen de los tilacoides. Es posible que la eficiencia del transporte de la proteína desde el estroma al lúmen de los tilacoides no sea óptima por contener un péptido señal heterólogo. De hecho, en los experimentos de fraccionamiento se observó que una subpoblación de la proteína que conservaba el péptido señal se obtenía en la fracción de membranas tilacoidales. En este caso, se esperaría que en condiciones de mayor actividad biosintética -como lo sería la

alta iluminación-, la proteína recombinante podría acumularse en el complejo de translocación de la membrana tilacoidal, y/o en estroma donde provocaría un efecto tóxico.

En un trabajo de Bally y colaboradores (2008) se demuestra que tanto en el estroma como en el lumen de los tilacoides del cloroplasto se pueden formar los puentes disulfuro de una proteína recombinante. La comparación entre la planta VHH y pep-VHH de primeras rondas de regeneración *in vitro*, indicó una mejor acumulación de la proteína cuando esta era direccionada al lumen. Podría plantearse ante este resultado que VHH puede adoptar la conformación correcta en el lumen por la formación de puentes disulfuro, y que sufre allí una menor degradación. Alternativamente, su mayor acumulación podría deberse a que en el lumen no provocaría un efecto tóxico y no se gatillaría una degradación generalizada de proteínas. Entonces, es difícil determinar si la mejor acumulación de VHH en el lumen se debe a una mayor estabilidad de la proteína, a la disminución del efecto tóxico provocado por la misma, o a una combinación de ambos factores.

La estrategia de fusionar la proteína de interés a otra con estabilidad conocida ha sido empleada previamente con resultados alentadores. La escasa acumulación del interferón recombinante en el estroma de cloroplasto (0,1% de las PST) pudo ser mejorada significativamente mediante su fusión a la β-glucuronidasa en plantas transplastómicas, alcanzando niveles de expresión del 6% de las PST (Lelavathi y Reddy, 2003). Un caso muy similar fue el de la somatotropina expresada en plantas transplastómicas, en el cual se observó una mejora de los niveles del 0,1% al 7% de las PST mediante su fusión a ubiquitina (Staub y col., 2000). La gran estabilidad de la β-glucuronidasa en el estroma del cloroplasto nos llevó a plantear como estrategia su fusión a otras proteínas recombinantes para incrementar niveles de expresión en este compartimento celular. Como se mencionó anteriormente, esta estrategia fue totalmente contraproducente para el antígeno VP8*. Sin embargo, para el anticuerpo VHH la fusión a la enzima β-glucuronidasa permitió obtener resultados alentadores. La proteína de fusión GUS-E-VHH se acumuló en buenos niveles (3% de las PST; 70 μg/g TF), las plantas no presentaron problemas de desarrollo y fue posible liberar el VHH de la proteína de fusión mediante el tratamiento con la enzima enteroquinasa. Si la toxicidad observada en las plantas VHH y pep-VHH se debiera al reconocimiento e inactivación de alguna proteína de estroma por este VHH particular, es probable que la fusión con la β-glucuronidasa evite que el VHH reconozca a esta proteína endógena. Los nanoanticuerpos han sido utilizados para modular la función de enzimas en plantas. Se ha demostrado la inhibición de la enzima ramificadora del almidón en el estroma del cloroplasto de papa al dirigir un VHH contra esta molécula (Jobling y col., 2003). En el trabajo mencionado, el anticuerpo se acumulaba en el cloroplasto de plantas de papa transgénicas en un nivel de 0,03% de las PST. Mediante otra estrategia, en el trabajo de Magee y colaboradores (2004) se intentó expresar un VHH en el estroma de cloroplastos. Estas plantas transplastómicas de tabaco no acumulaban el anticuerpo en niveles detectables por ELISA, a pesar de comprobarse la transcripción del transgén y la funcionalidad de los ARN mensajeros sintetizados. En un trabajo reciente se evaluó la producción de un VHH mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthaminana* utilizando un vector viral. Las distintas versiones del vector viral permitían, mediante el uso de señales de direccionamiento

adecuadas, la acumulación del VHH en citoplasma, apoplasto y cloroplasto (Teh y Kavanagh, 2009). Se observó una diferencia dramática en los niveles de expresión según el compartimiento subcelular elegido. En citoplasma y en estroma del cloroplasto la molécula era prácticamente indetectable, mientras que cuando se dirigía al apoplasto lograron niveles de 30% de las PST. Los resultados presentados en este trabajo y los publicados muestran que todavía se necesitan mayores estudios para estandarizar la producción de VHHs en plantas, y aparentemente el estroma no sería un ambiente ideal para su expresión. La estrategia usada para mejorar la expresión de VHHs en citoplasma de *E. coli* que consiste en coexpresar una chaperona (Olichon y Surrey, 2007) podría ayudar a mejorar su expresión en estroma.

A fin de determinar si el efecto nocivo en las plantas se debe al clon VHH 3B2 o es general de los VHHs, se están desarrollando plantas transplastómicas que expresen otro nanoanticuerpo dirigido contra un antígeno no relacionado. A su vez, se estan generando otras plantas que redireccionen el VHH 3B2 al lumen de los tilacoides mediante un péptido señal endógeno. La mejora en la eficiencia de la translocación podría evitar su acumulación en estroma y la toxicidad observada. La información que estas nuevas plantas transplastómicas brindarán será de suma importancia y así poder concluir sobre la factibilidad de su uso para la expresión de estas moléculas. Se están realizando ensayos a pequeña escala de purificación de las proteínas recombinantes a partir de plantas pep-VHH y GUS-E-VHH con resinas de niquel, para posteriormente comprobar su funcionalidad: confirmar el reconocimiento de VP6 de RVB y la eventual inactivación del virus.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral junto a los numerosos trabajos en el tema, aportan evidencias que promueven el uso y optimización de las plantas transplastómicas como biorreactores, para llegar a ser alternativas rentables y concretas de uso en la industria.

Lic. Ezequiel Matías Lentz

Dr. Fernando Félix Bravo-Almonacid

Director

Dr. Andrés Wigdorovitz

Director asistente

MATERIALES
y
MÉTODOS

Materiales y métodos

Cepas bacterianas.

Se utilizó la cepa DH10B de *Escherichia coli*. Los cultivos líquidos crecieron a 37 ºC en medio LB (peptona de caseína o triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, y NaCl 10 g/L) con agitación a 220 r.p.m. Los cultivos en medio sólido se crecieron en placas de Petri a 37 ºC en medio LB adicionado con 1,6% (m/v) de agar. El medio se suplementó con antibióticos de acuerdo a la resistencia otorgada por cada plásmido y en las siguientes concentraciones: ampicilina 100 mg/L, kanamicina 50 mg/L, espectinomicina 100 mg/L.

Preparación de células electrocompetentes de *E. coli.*

A partir de una colonia aislada se creció un cultivo de 10 ml toda la noche. Se realizó una dilución 1:100 del cultivo, y se continuó la incubación en un volúmen de 300 ml hasta alcanzar una densidad óptica medida a 600 nm que estuviera entre 0,5 y 1. Se enfrió el cultivo en hielo 30 min, y se centrifugó a 4.000 *g* 15 min. Se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 1 L de agua (0 °C). Se repitió la centrifugación y resuspensión utilizando 500 ml de agua (0 °C) y los lavados se repitieron resuspendiendo luego en 20 ml de glicerol 10% (v/v) (0 °C) y finalmente en 2 ml de glicerol 10% (v/v) (0 °C). La preparación fue alicuotada y mantenida a -70 °C hasta su utilización.

Transformación de células competentes de *E. coli* por electroporación.

Se agregó 1 μl de la preparación de ADN a 50 μl de células electrocompetentes, se incubó 5 min en hielo, y se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación de 0,2 mm. Se utilizó el programa Ec2 del electroporador *Micropulser* (BIO-RAD), y luego del pulso eléctrico se agregó inmediatamente 1 ml de medio LB a la cubeta, y se trasvasó el volúmen a un microtubo de 1,7 ml. Las células se incubaron 1 h a 37 °C, y luego se plaqueó una alícuota de 100 μl en medio LB sólido con antibiótico. Las colonias fueron visualizadas luego de la incubación de las placas durante toda la noche a 37 °C.

Líneas de plantas.

Nicotiana tabacum cv. Petit Havana: Línea usada para la generación de plantas transplastómicas.

βGUS: Planta transplastómica de tabaco transformada con el gen *uidA* (Segretin, 2009).

NU: Planta transgénica nuclear de tabaco transformada con el gen *uidA* (Segretin, 2009).

T1A: Planta de alfalfa transgénica nuclear transformada con el gen codificante para VP-βGUS, bajo el promotor CaMV35S (Dus Santos y col., 2002).

T1B14: Planta de alfalfa transgénica nuclear transformada con el gen codificante para VP-βGUS, bajo el promotor CVMV. Línea generada por la Dra. Dus Santos (Instituto de Virología, INTA Castelar).

Aislamientos virales.

El virus de la fiebre aftosa utilizado en los estudios, provino del aislamiento O1Campos (Zamorano y col., 1995), producido en el laboratorio del Dr. Andrés Wigdorovitz (Instituto de Virología, INTA-Castelar).

El rotavirus bovino utilizado fue preparado por la Dra. Marina Mozgovoj (Instituto de Virología, INTA-Castelar), y corresponde a la cepa C486 G6P[1].

Plásmidos.

pZErO-2 (Invitrogen): Vector para clonado de productos de PCR con extremos romos.

pBI221 VP-βGUS: Construcción utilizada para obtener la secuencia de la fusión VP-βGUS (Dus Santos y col., 2002).

pBSW-utr/hEGF: Construcción utilizada como control negativo en ensayos de actividad β-glucuronidasa, conteniendo la secuencia del factor de crecimiento epidérmico humano, *hEGF* (Wirth y col., 2006).

pBSW-utr: Vector de transformación de cloroplastos (Wirth y col., 2006).

pBSW-utr/βGUS: Vector de transformación de cloroplastos, conteniendo la secuencia del gen *uidA* (Segretin, 2009).

pGEM/VP8*: Construcción utilizada para obtener la secuencia de VP8* de rotavirus bovino C486 (Mozgovoj y col., 2004b).

pHEN6/VHH: Construcción utilizada para obtener la secuencia de VHH clon 3B2 contra VP6 de rotavirus bovino C486 (Garaicoechea y col., 2008). El vector pHEN6 es un derivado del pHEN1, y contiene el péptido de direccionamiento a periplasma de la proteína pectato liasa B de *Erwinia carotovora* (Better y col., 1988; Hoogenboom y col., 1991; Ghahroudi y col., 1997; Conrath y col., 2001).

Secuencias:

VP-*β*GUS: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de VP-*β*GUS**.** Esta quimera consiste en el epítope contenido en los aminoácidos 135-160 de VP1 del virus de la fiebre aftosa, fusionados al extremo N-terminal de la enzima bacteriana *β*-glucuronidasa. Se muestran subrayados en la secuencia nucleotídica los sitios NdeI (CATATG) y XbaI (TCTAGA), utilizados para el subclonado y los codones de iniciación y fin de la traducción (en negrita). Se indica en la secuencia aminoacídica los residuos correspondientes al péptido p135-160 (sombreado).

```
0001   CAT**ATG**AGATAC TCAAGAAACGCT GTTCCTAACGTT AGAGGAGATCTT CAGGTTCTTGCT CAAAAGGTTGCT
0001       M  R  Y   S  R  N  A   V  P  N  V   R  G  D  L   Q  V  L  A   Q  K  V  A
0073   AGAACTCTTCCT GGATCCCCGGGT GGTCAGTCCCTT ATGTTACGTCCT GTAGAAACCCCA ACCCGTGAAATC
0024    R  T  L  P   G  S  P  G   G  Q  S  L   M  L  R  P   V  E  T  P   T  R  E  I
0145   AAAAAACTCGAC GGCCTGTGGGCA TTCAGTCTGGAT CGCGAAAACTGT GGAATTGATCAG CGTTGGTGGGAA
0048    K  K  L  D   G  L  W  A   F  S  L  D   R  E  N  C   G  I  D  Q   R  W  W  E
0217   AGCGCGTTACAA GAAAGCCGGGCA ATTGCTGTGCCA GGCAGTTTTAAC GATCAGTTCGCC GATGCAGATATT
0072    S  A  L  Q   E  S  R  A   I  A  V  P   G  S  F  N   D  Q  F  A   D  A  D  I
0289   CGTAATTATGCG GGCAACGTCTGG TATCAGCGCGAA GTCTTTATACCG AAAGGTTGGGCA GGCCAGCGTATC
0096    R  N  Y  A   G  N  V  W   Y  Q  R  E   V  F  I  P   K  G  W  A   G  Q  R  I
0361   GTGCTGCGTTTC GATGCGGTCACT CATTACGGCAAA GTGTGGGTCAAT AATCAGGAAGTG ATGGAGCATCAG
0144    V  L   R F   D  A  V  T   H  Y  G  K   V  W  V  N   N  Q  E  V   M  E  H  Q
0433   GGCGGCTATACG CCATTTGAAGCC GATGTCACGCCG TATGTTATTGCC GGGAAAAGTGTA CGTATCACCGTT
0168    G  G  Y  T   P  F  E  A   D  V  T  P   Y  V  I  A   G  K  S  V   R  I  T  V
0505   TGTGTGAACAAC GAACTGAACTGG CAGACTATCCCG CCGGGAATGGTG ATTACCGACGAA AACGGCAAGAAA
0192    C  V  N  N   E  L  N  W   Q  T  I  P   P  G  M  V   I  T  D  E   N  G  K  K
0577   AAGCAGTCTTAC TTCCATGATTTC TTTAACTATGCC GGAATCCATCGC AGCGTAATGCTC TACACCACGCCG
0185    K  Q  S  Y   F  H  D  F   F  N  Y  A   G  I  H  R   S  V  M  L   Y  T  T  P
0649   AACACCTGGGTG GACGATATCACC GTGGTGACGCAT GTCGCGCAAGAC TGTAACCACGCG TCTGTTGACTGG
0216    N  T  W  V   D  D  I  T   V  V  T  H   V  A  Q  D   C  N  H  A   S  V  D  W
0721   CAGGTGGTGGCC AATGGTGATGTC AGCGTTGAACTG CGTGATGCGGAT CAACAGGTGGTT GCAACTGGACAA
0240    Q  V  V  A   N  G  D  V   S  V  E  L   R  D  A  D   Q  Q  V  V   A  T  G  Q
0793   GGCACTAGCGGG ACTTTGCAAGTG GTGAATCCGCAC CTCTGGCAACCG GGTGAAGGTTAT CTCTATGAACTG
0264    G  T  S  G   T  L  Q  V   V  N  P  H   L  W  Q  P   G  E  G  Y   L  Y  E  L
0865   TGCGTCACAGCC AAAAGCCAGACA GAGTGTGATATC TACCCGCTTCGC GTCGGCATCCGG TCAGTGGCAGTG
0288    C  V  T  A   K  S  Q  T   E  C  D  I   Y  P  L  R   V  G  I   R  S  V  A  V
0937   AAGGGCGAACAG TTCCTGATTAAC CACAAACCGTTC TACTTTACTGGC TTTGGTCGTCAT GAAGATGCGGAC
0312    K  G  E  Q   F  L  I  N   H  K  P  F   Y  F  T  G   F  G  R  H   E  D  A  D
1009   TTGCGTGGCAAA GGATTCGATAAC GTGCTGATGGTG CACGACCACGCA TTAATGGACTGG ATTGGGGCCAAC
0336    L  R  G  K   G  F  D  N   V  L  M  V   H  D  H  A   L  M  D  W   I  G  A  N
1081   TCCTACCGTACC TCGCATTACCCT TACGCTGAAGAG ATGCTCGACTGG GCAGATGAACAT GGCATCGTGGTG
0360    S  Y  R  T   S  H  Y  P   Y  A  E  E   M  L  D  W   A  D  E  H   G  I  V  V
1153   ATTGATGAAACT GCTGCTGTCGGC TTTAACCTCTCT TTAGGCATTGGT TTCGAAGCGGGC AACAAGCCGAAA
0384    I  D  E  T   A  A  V  G   F  N  L  S   L  G  I  G   F  E  A  G   N  K  P  K
1225   GAACTGTACAGC GAAGAGGCAGTC AACGGGGAAACT CAGCAAGCGCAC TTACAGGCGATT AAAGAGCTGATA
0408    E  L  Y  S   E  E  A  V   N  G  E  T   Q  Q  A  H   L  Q  A  I   K  E  L  I
1297   GCGCGTGACAAA AACCACCCAAGC GTGGTGATGTGG AGTATTGCCAAC GAACCGGATACC CGTCCGCAAGGT
0432    A  R  D  K   N  H  P  S   V  V  M  W   S  I  A  N   E  P  D  T   R  P  Q  G
1369   GCACGGGAATAT TTCGCGCCACTG GCGGAAGCAACG CGTAAACTCGAC CCGACGCGTCCG ATCACCTGCGTC
0456    A  R  E  Y   F  A  P  L   A  E  A  T   R  K  L  D   P  T  R  P   I  T  C  V
1441   AATGTAATGTTC TGCGACGCTCAC ACCGATACCATC AGCGATCTCTTT GATGTGCTGTGC CTGAACCGTTAT
0480    N  V  M  F   C  D  A  H   T  D  T  I   S  D  L  F   D  V  L  C   L  N  R  Y
1513   TACGGATGGTAT GTCCAAAGCGGC GATTTGGAAACG GCAGAGAAGGTA CTGGAAAAAGAA CTTCTGGCCTGG
0504    Y  G  W  Y   V  Q  S  G   D  L  E  T   A  E  K  V   L  E  K  E   L  L  A  W
1585   CAGGAGAAACTG CATCAGCCGATT ATCATCACCGAA TACGGCGTGGAT ACGTTAGCCGGG CTGCACTCAATG
0528    Q  E  K  L   H  Q  P  I   I  I  T  E   Y  G  V  D   T  L  A  G   L  H  S  M
1657   TACACCGACATG TGGAGTGAAGAG TATCAGTGTGCA TGGCTGGATATG TATCACCGCGTC TTTGATCGCGTC
0552    Y  T  D  M   W  S  E  E   Y  Q  C  A   W  L  D  M   Y  H  R  V   F  D  R  V
1729   AGCGCCGTCGTC GGTGAACAGGTA TGGAATTTCGCC GATTTTGCGACC TCGCAAGGCATA TTGCGCGTTGGC
0576    S  A  V  V   G  E  Q  V   W  N  F  A   D  F  A  T   S  Q  G  I   L  R  V  G
1801   GGTAACAAGAAA GGGATCTTCACT CGCGACCGCAAA CCGAAGTCGGCG GCTTTTCTGCTG CAAAAACGCTGG
0600    G  N  K  K   G  I  F  T   R  D  R  K   P  K  S  A   A  F  L  L   Q  K  R  W
1873   ACTGGCATGAAC TTCGGTGAAAAA CCGCAGCAGGGA GGCAAACAA**TGA** ATCTAGA
0624    T  G  M  N   F  G  E  K   P  Q  Q  G   G  K  Q  *
```

VP8*: Secuencia nucleotídica y aminoacídica del antígeno de rotavirus bovino VP8***.** Se indican los sitios NdeI y XbaI (CATATG y TCTAGA, respectivamente, subrayados) utilizados para el subclonado y los codones de iniciación y fin de la traducción (en negrita).

```
0001   CAT**ATG**GCTTCA CTCATTTATAGA CAGTTGCTTACT AATTCATACACA GTAGAACTTTCA GATGAAATCCAA
0001       M  A  S   L  I  Y  R   Q  L  L  T   N  S  Y  T   V  E  L  S   D  E  I  Q
0073   GAAATTGGATCG ACTAAGACTCAA AACGTTACCGTT AATCCAGGACCG TTCGCGCAAACA AATTACGCTTCA
0024    E  I  G  S   T  K  T  Q   N  V  T  V   N  P  G  P   F  A  Q  T   N  Y  A  S
0145   GTTAATTGGGGA CCTGGTGAAACG AATGACTCAACT ACAGTTGAACCA GTGCTTGATGGA CCATATCAACCA
0048    V  N  W  G   P  G  E  T   N  D  S  T   T  V  E  P   V  L  D  G   P  Y  Q  P
0217   ACGACTTTTAAT CCACCTGTAAGT TATTGGATGTTG TTAGCACCAACG AACGCGGGGGTG GTAGCTGAAGGT
0072    T  T  F  N   P  P  V  S   Y  W  M  L   L  A  P  T   N  A  G  V   V  A  E  G
0289   ACGAACAATACA AACAGATGGTTA GCGACAATATTA ATTGAACCAAAT GTACAGCAAGTT GAGCGAACATAT
0096    T  N  N  T   N  R  W  L   A  T  I  L   I  E  P  N   V  Q  Q  V   E  R  T  Y
0361   ACATTATTTGGG CAACAAGTTCAA GTAACAGTATCA AATGATTCACAG ACAAAGTGGAAG TTTGTGGATCTA
0120    T  L  F  G   Q  Q  V  Q   V  T  V  S   N  D  S  Q   T  K  W  K   F  V  D  L
0433   AGTAAGCAGACA CAAGATGGTAAT TATTCACAACAC GGTCCTCTACTG TCAACACCGAAA CTGTATGGAGTG
0144    S  K  Q  T   Q  D  G  N   Y  S  Q  H   G  P  L  L   S  T  P  K   L  Y  G  V
0505   ATGAAACATGGA GGTAAAATTTAC ACTTATAATGGA GAGACACCGAAC GCAACTACTGGT TACTACTCTACA
0168    M  K  H  G   G  K  I  Y   T  Y  N  G   E  T  P  N   A  T  T  G   Y  Y  S  T
0577   ACTAACTTTGAC ACTGTAAACATG ACAGCATATTGT GATTTTTATATA ATTCCATTAGCA CAAGAAGCAAAA
0192    T  N  F  D   T  V  N  M   T  A  Y  C   D  F  Y  I   I  P  L  A   Q  E  A  K
0649   TGCACTGAATAC ATAAATAATGGA TTACCACCAATA CAAAATACGAGA AATATCGTACCA GTTTCGATAGTA
0216    C  T  E  Y   I  N  N  G   L  P  P  I   Q  N  T  R   N  I  V  P   V  S  I  V
0721   TCAAGGAATATT GTATATACAAGA **TAA**TCTAGA
0240    S  R  N  I   V  Y  T  R   *
```

str-VP8*: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de str-VP8***.** Esta construcción contiene la secuencia que codifica el péptido señal de translocación al lumen de los tilacoides de la proteína OE23 de *N. tabacum* (clonada por el Lic. Mauro Morgenfeld como parte de su Tesis Doctoral), fusionada a la secuencia completa de VP8*. Se resalta la señal bipartita de OE23 (sombreado), el motivo TAT (*Twin-Arginine-Translocation*) definido por dos argininas contiguas (Jarvis y Robinson, 2004), y el sitio ADA de corte por la peptidasa tilacoidal (von Heijne y col. 1989). Los codones de iniciación y fin de la traducción se indican en negrita.

```
0001   **ATG**GCTTCAACA CAATGTTTCTTG CACCAACATGCA CTTTCTAGCTCT GCAGCTAGAACA ACATCCTCAGTG
0001    M  A  S  T   Q  C  F  L   H  Q  H  A   L  S  S  S   A  A  R  T   T  S  S  V
0073   TCATCACAGAGG TACGTTTCATCC CTTAAGCCTAAC CAACTGGTTTGC CGTGCCCAAAAA CAGTCCTCGGCT
0025    S  S  Q  R   Y  V  S  S   L  K  P  N   Q  L  V  C   R  A  Q  K   Q  S  S  A
0145   CAAGAAGATGAT GGCAACAGCGTC GCCGTCTCTCGA CGATTGGCTCTC ACTGTCCTCATT GGTGCTGCTGCC
0049    Q  E  D  D   G  N  S  V   A  V  S  **R**  **R**  L  A  L   T  V  L  I   G  A  A  A
0217   GTTGGTTCCAAA GTTTCCCCTGCA GATGCTCATATG GCTTCACTCATT TATAGACAGTTG CTTACTAATTCA
0073    V  G  S  K   V  S  P  **A**  **D**  **A**  H  M   A  S  L  I   Y  R  Q  L   L  T  N  S
0289   TACACAGTAGAA CTTTCAGATGAA ATCCAAGAAATT GGATCGACTAAG ACTCAAAACGTT ACCGTTAATCCA
0097    Y  T  V  E   L  S  D  E   I  Q  E  I   G  S  T  K   T  Q  N  V   T  V  N  P
0361   GGACCGTTCGCG CAAACAAATTAC GCTTCAGTTAAT TGGGGACCTGGT GAAACGAATGAC TCAACTACAGTT
0121    G  P  F  A   Q  T  N  Y   A  S  V  N   W  G  P  G   E  T  N  D   S  T  T  V
0433   GAACCAGTGCTT GATGGACCATAT CAACCAACGACT TTTAATCCACCT GTAAGTTATTGG ATGTTGTTAGCA
0145    E  P  V  L   D  G  P  Y   Q  P  T  T   F  N  P  P   V  S  Y  W   M  L  L  A
0505   CCAACGAACGCG GGGGTGGTAGCT GAAGGTACGAAC AATACAAACAGA TGGTTAGCGACA ATATTAATTGAA
0169    P  T  N  A   G  V  V  A   E  G  T  N   N  T  N  R   W  L  A  T   I  L  I  E
0577   CCAAATGTACAG CAAGTTGAGCGA ACATATACATTA TTTGGGCAACAA GTTCAAGTAACA GTATCAAATGAT
0193    P  N  V  Q   Q  V  E  R   T  Y  T  L   F  G  Q  Q   V  Q  V  T   V  S  N  D
0649   TCACAGACAAAG TGGAAGTTTGTG GATCTAAGTAAG CAGACACAAGAT GGTAATTATTCA CAACACGGTCCT
0217    S  Q  T  K   W  K  F  V   D  L  S  K   Q  T  Q  D   G  N  Y  S   Q  H  G  P
0721   CTACTGTCAACA CCGAAACTGTAT GGAGTGATGAAA CATGGAGGTAAA ATTTACACTTAT AATGGAGAGACA
0241    L  L  S  T   P  K  L  Y   G  V  M  K   H  G  G  K   I  Y  T  Y   N  G  E  T
0793   CCGAACGCAACT ACTGGTTACTAC TCTACAACTAAC TTTGACACTGTA AACATGACAGCA TATTGTGATTTT
0265    P  N  A  T   T  G  Y  Y   S  T  T  N   F  D  T  V   N  M  T  A   Y  C  D  F
0865   TATATAATTCCA TTAGCACAAGAA GCAAAATGCACT GAATACATAAAT AATGGATTACCA CCAATACAAAAT
0289    Y  I  I  P   L  A  Q  E   A  K  C  T   E  Y  I  N   N  G  L  P   P  I  Q  N
0937   ACGAGAAATATC GTACCAGTTTCG ATAGTATCAAGG AATATTGTATAT ACAAGA**TAA**
0313    T  R  N  I   V  P  V  S   I  V  S  R   N  I  V  Y   T  R  *
```

GUS-E-VP8*: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de GUS-E-VP8*. Esta fusión consiste en las secuencias de la enzima bacteriana β-glucuronidasa (GUS), el sitio de corte para enteroquinasa (E), y el antígeno VP8*. Subrayados se indican los sitios NdeI (CATATG), HindIII (AAGCTT) y XbaI (TCTAGA), utilizados para el subclonado y los codones de iniciación y fin de la traducción en negrita. La secuencia de corte reconocida por la enteroquinasa se encuentra sombreada.

```
0001   CAT**ATG**TTACGT CCTGTAGAAACC CCAACCCGTGAA ATCAAAAAACTC GACGGCCTGTGG GCATTCAGTCTG
0001       M  L  R   P  V  E  T   P  T  R  E   I  K  K  L   D  G  L  W   A  F  S  L
0073   GATCGCGAAAAC TGTGGAATTGAT CAGCGTTGGTGG GAAAGCGCGTTA CAAGAAAGCCGG GCAATTGCTGTG
0024    D  R  E  N   C  G  I  D   Q  R  W  W   E  S  A  L   Q  E  S  R   A  I  A  V
0145   CCAGGCAGTTTT AACGATCAGTTC GCCGATGCAGAT ATTCGTAATTAT GCGGGCAACGTC TGGTATCAGCGC
0048    P  G  S  F   N  D  Q  F   A  D  A  D   I  R  N  Y   A  G  N  V   W  Y  Q  R
0217   GAAGTCTTTATA CCGAAAGGTTGG GCAGGCCAGCGT ATCGTGCTGCGT TTCGATGCGGTC ACTCATTACGGC
0072    E  V  F  I   P  K  G  W   A  G  Q  R   I  V  L  R   F  D  A  V   T  H  Y  G
0289   AAAGTGTGGGTC AATAATCAGGAA GTGATGGAGCAT CAGGGCGGCTAT ACGCCATTTGAA GCCGATGTCACG
0096    K  V  W  V   N  N  Q  E   V  M  E  H   Q  G  G  Y   T  P  F  E   A  D  V  T
0361   CCGTATGTTATT GCCGGGAAAAGT GTACGTATCACC GTTTGTGTGAAC AACGAACTGAAC TGGCAGACTATC
0120    P  Y  V  I   A  G  K  S   V  R  I  T   V  C  V  N   N  E  L  N   W  Q  T  I
0433   CCGCCGGGAATG GTGATTACCGAC GAAAACGGCAAG AAAAAGCAGTCT TACTTCCATGAT TTCTTTAACTAT
0144    P  P  G  M   V  I  T  D   E  N  G  K   K  K  Q  S   Y  F  H  D   F  F  N  Y
0505   GCCGGAATCCAT CGCAGCGTAATG CTCTACACCACG CCGAACACCTGG GTGGACGATATC ACCGTGGTGACG
0168    A  G  I  H   R  S  V  M   L  Y  T  T   P  N  T  W   V  D  D  I   T  V  V  T
0577   CATGTCGCGCAA GACTGTAACCAC GCGTCTGTTGAC TGGCAGGTGGTG GCCAATGGTGAT GTCAGCGTTGAA
0192    H  V  A  Q   D  C  N  H   A  S  V  D   W  Q  V  V   A  N  G  D   V  S  V  E
0649   CTGCGTGATGCG GATCAACAGGTG GTTGCAACTGGA CAAGGCACTAGC GGGACTTTGCAA GTGGTGAATCCG
0216    L  R  D  A   D  Q  Q  V   V  A  T  G   Q  G  T  S   G  T  L  Q   V  V  N  P
0721   CACCTCTGGCAA CCGGGTGAAGGT TATCTCTATGAA CTGTGCGTCACA GCCAAAAGCCAG ACAGAGTGTGAT
0240    H  L  W  Q   P  G  E  G   Y  L  Y  E   L  C  V  T   A  K  S  Q   T  E  C  D
0793   ATCTACCCGCTT CGCGTCGGCATC CGGTCAGTGGCA GTGAAGGGCGAA CAGTTCCTGATT AACCACAAACCG
0264    I  Y  P  L   R  V  G  I   R  S  V  A   V  K  G  E   Q  F  L  I   N  H  K  P
0865   TTCTACTTTACT GGCTTTGGTCGT CATGAAGATGCG GACTTGCGTGGC AAAGGATTCGAT AACGTGCTGATG
0288    F  Y  F  T   G  F  G  R   H  E  D  A   D  L  R  G   K  G  F  D   N  V  L  M
0937   GTGCACGACCAC GCATTAATGGAC TGGATTGGGGCC AACTCCTACCGT ACCTCGCATTAC CCTTACGCTGAA
0312    V  H  D  H   A  L  M  D   W  I  G  A   N  S  Y  R   T  S  H  Y   P  Y  A  E
1009   GAGATGCTCGAC TGGGCAGATGAA CATGGCATCGTG GTGATTGATGAA ACTGCTGCTGTC GGCTTTAACCTC
0336    E  M  L  D   W  A  D  E   H  G  I  V   V  I  D  E   T  A  A  V   G  F  N  L
1081   TCTTTAGGCATT GGTTTCGAAGCG GGCAACAAGCCG AAAGAACTGTAC AGCGAAGAGGCA GTCAACGGGGAA
0360    S  L  G  I   G  F  E  A   G  N  K  P   K  E  L  Y   S  E  E  A   V  N  G  E
1153   ACTCAGCAAGCG CACTTACAGGCG ATTAAAGAGCTG ATAGCGCGTGAC AAAAACCACCCA AGCGTGGTGATG
0384    T  Q  Q  A   H  L  Q  A   I  K  E  L   I  A  R  D   K  N  H  P   S  V  V  M
1225   TGGAGTATTGCC AACGAACCGGAT ACCCGTCCGCAA GGTGCACGGGAA TATTTCGCGCCA CTGGCGGAAGCA
0408    W  S  I  A   N  E  P  D   T  R  P  Q   G  A  R  E   Y  F  A  P   L  A  E  A
1297   ACGCGTAAACTC GACCCGACGCGT CCGATCACCTGC GTCAATGTAATG TTCTGCGACGCT CACACCGATACC
0432    T  R  K  L   D  P  T  R   P  I  T  C   V  N  V  M   F  C  D  A   H  T  D  T
1369   ATCAGCGATCTC TTTGATGTGCTG TGCCTGAACCGT TATTACGGATGG TATGTCCAAAGC GGCGATTTGGAA
0456    I  S  D  L   F  D  V  L   C  L  N  R   Y  Y  G  W   Y  V  Q  S   G  D  L  E
1441   ACGGCAGAGAAG GTACTGGAAAAA GAACTTCTGGCC TGGCAGGAGAAA CTGCATCAGCCG ATTATCATCACC
0480    T  A  E  K   V  L  E  K   E  L  L  A   W  Q  E  K   L  H  Q  P   I  I  I  T
1513   GAATACGGCGTG GATACGTTAGCC GGGCTGCACTCA ATGTACACCGAC ATGTGGAGTGAA GAGTATCAGTGT
0504    E  Y  G  V   D  T  L  A   G  L  H  S   M  Y  T  D   M  W  S  E   E  Y  Q  C
1585   GCATGGCTGGAT ATGTATCACCGC GTCTTTGATCGC GTCAGCGCCGTC GTCGGTGAACAG GTATGGAATTTC
0528    A  W  L  D   M  Y  H  R   V  F  D  R   V  S  A  V   V  G  E  Q   V  W  N  F
1657   GCCGATTTTGCG ACCTCGCAAGGC ATATTGCGCGTT GGCGGTAACAAG AAAGGGATCTTC ACTCGCGACCGC
0552    A  D  F  A   T  S  Q  G   I  L  R  V   G  G  N  K   K  G  I  F   T  R  D  R
1729   AAACCGAAGTCG GCGGCTTTTCTG CTGCAAAAACGC TGGACTGGCATG AACTTCGGTGAA AAACCGCAGCAG
0576    K  P  K  S   A  A  F  L   L  Q  K  R   W  T  G  M   N  F  G  E   K  P  Q  Q
1801   GGAGGCAAACAA GCTTTAGACGAT GACGATAAGATG GCTTCACTCATT TATAGACAGTTG CTTACTAATTCA
0600    G  G  K  Q   A  L  D  D   D  D  K  M   A  S  L  I   Y  R  Q  L   L  T  N  S
1873   TACACAGTAGAA CTTTCAGATGAA ATCCAAGAAATT GGATCGACTAAG ACTCAAAACGTT ACCGTTAATCCA
0624    Y  T  V  E   L  S  D  E   I  Q  E  I   G  S  T  K   T  Q  N  V   T  V  N  P
1945   GGACCGTTCGCG CAAACAAATTAC GCTTCAGTTAAT TGGGGACCTGGT GAAACGAATGAC TCAACTACAGTT
0648    G  P  F  A   Q  T  N  Y   A  S  V  N   W  G  P  G   E  T  N  D   S  T  T  V
2017   GAACCAGTGCTT GATGGACCATAT CAACCAACGACT TTTAATCCACCT GTAAGTTATTGG ATGTTGTTAGCA
0672    E  P  V  L   D  G  P  Y   Q  P  T  T   F  N  P  P   V  S  Y  W   M  L  L  A
2089   CCAACGAACGCG GGGGTGGTAGCT GAAGGTACGAAC AATACAAACAGA TGGTTAGCGACA ATATTAATTGAA
0696    P  T  N  A   G  V  V  A   E  G  T  N   N  T  N  R   W  L  A  T   I  L  I  E
2161   CCAAATGTACAG CAAGTTGAGCGA ACATATACATTA TTTGGGCAACAA GTTCAAGTAACA GTATCAAATGAT
0720    P  N  V  Q   Q  V  E  R   T  Y  T  L   F  G  Q  Q   V  Q  V  T   V  S  N  D
2233   TCACAGACAAAG TGGAAGTTTGTG GATCTAAGTAAG CAGACACAAGAT GGTAATTATTCA CAACACGGTCCT
0744    S  Q  T  K   W  K  F  V   D  L  S  K   Q  T  Q  D   G  N  Y  S   Q  H  G  P
2305   CTACTGTCAACA CCGAAACTGTAT GGAGTGATGAAA CATGGAGGTAAA ATTTACACTTAT AATGGAGAGACA
0768    L  L  S  T   P  K  L  Y   G  V  M  K   H  G  G  K   I  Y  T  Y   N  G  E  T
```

```
2377   CCGAACGCAACT ACTGGTTACTAC TCTACAACTAAC TTTGACACTGTA AACATGACAGCA TATTGTGATTTT
0792    P  N  A  T   T  G  Y  Y   S  T  T  N   F  D  T  V   N  M  T  A   Y  C  D  F
2449   TATATAATTCCA TTAGCACAAGAA GCAAAATGCACT GAATACATAAAT AATGGATTACCA CCAATACAAAAT
0816    Y  I  I  P   L  A  Q  E   A  K  C  T   E  Y  I  N   N  G  L  P   P  I  Q  N
2521   ACGAGAAATATC GTACCAGTTTCG ATAGTATCAAGG AATATTGTATAT ACAAGATAATCT AGA
0840    T  R  N  I   V  P  V  S   I  V  S  R   N  I  V  Y   T  R  *
```

VHH: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de VHH clon 3B2**.** Se indican los sitios NdeI y XbaI (CATATG y TCTAGA, respectivamente, subrayados) utilizados para el subclonado y los codones de iniciación y fin de la traducción (en negrita).

```
0001   CATATGGCTGAT GTGCAGCTGCAG GCGTCTGGGGGA GGTTTGGCGCAG GCTGGGGACTCT CTGACACTCTCC
0001       M  A  D   V  Q  L  Q   A  S  G  G   G  L  A  Q   A  G  D  S   L  T  L  S
0073   TGTGCAGCCTCT GGACGCACCTTC AGTGGTTATGTC GTGGGCTGGTTC CGCCAGGCTCCA GGGGCGGAGCGT
0024    C  A  A  S   G  R  T  F   S  G  Y  V   V  G  W  F   R  Q  A  P   G  A  E  R
0145   GAGTTTGTAGGA GCTATTAGATGG TCAGAAGATAGC ACATGGTATGGA GACTCCATGAAG GGCCGAATTCTC
0048    E  F  V  G   A  I  R  W   S  E  D  S   T  W  Y  G   D  S  M  K   G  R  I  L
0217   ATCTCCAGAAAC AATATCAAGAAC ACGGTGAATCTG CAAATGTTCAAT CTAAAACCTGAA GACACGGCCGTG
0072    I  S  R  N   N  I  K  N   T  V  N  L   Q  M  F  N   L  K  P  E   D  T  A  V
0289   TACGTCTGTGCA GCAGGGGCCGGG GATATAGTGACT ACTGAGACTTCT TATAATTACTGG GGCCGGGGGACC
0096    Y  V  C  A   A  G  A  G   D  I  V  T   T  E  T  S   Y  N  Y  W   G  R  G  T
0361   CAGGTCACCGTC TCCTCACGCGGC CGCCACCACCAT CACCATCACTAA TAGTCTAGA
0120    Q  V  T  V   S  S  R  G   R  H  H  H   H  H  H  *
```

pep-VHH: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de VHH clon 3B2 precedida por el péptido bacteriano de direccionamiento a periplasma de la proteína pectato liasa B (sombreada) (Better y col., 1988). Subrayados se indican los sitios NdeI (CATATG) y XbaI (TCTAGA), y los codones de iniciación y fin de la traducción en negrita. También se resalta el codón ATG que codifica la metionina inicial de la VHH (en negrita y subrayado).

```
0001   CATATGAAATAC CTATTGCCTACG GCAGCCGCTGGA TTGTTATTACTC GCGGCCCAGCCG GCCATGGCTGAT
0001       M  K  Y   L  L  P  T   A  A  A   G  L  L  L  L   A  A  Q  P   A  M  A  D
0073   GTGCAGCTGCAG GCGTCTGGGGGA GGTTTGGCGCAG GCTGGGGACTCT CTGACACTCTCC TGTGCAGCCTCT
0024    V  Q  L  Q   A  S  G  G   G  L  A  Q   A  G  D  S   L  T  L  S   C  A  A  S
0145   GGACGCACCTTC AGTGGTTATGTC GTGGGCTGGTTC CGCCAGGCTCCA GGGGCGGAGCGT GAGTTTGTAGGA
0048    G  R  T  F   S  G  Y  V   V  G  W  F   R  Q  A  P   G  A  E  R   E  F  V  G
0217   GCTATTAGATGG TCAGAAGATAGC ACATGGTATGGA GACTCCATGAAG GGCCGAATTCTC ATCTCCAGAAAC
0072    A  I  R  W   S  E  D  S   T  W  Y  G   D  S  M  K   G  R  I  L   I  S  R  N
0289   AATATCAAGAAC ACGGTGAATCTG CAAATGTTCAAT CTAAAACCTGAA GACACGGCCGTG TACGTCTGTGCA
0096    N  I  K  N   T  V  N  L   Q  M  F  N   L  K  P  E   D  T  A  V   Y  V  C  A
0361   GCAGGGGCCGGG GATATAGTGACT ACTGAGACTTCT TATAATTACTGG GGCCGGGGGACC CAGGTCACCGTC
0120    A  G  A  G   D  I  V  T   T  E  T  S   Y  N  Y  W   G  R  G  T   Q  V  T  V
0433   TCCTCACGCGGC CGCCACCACCAT CACCATCACTAA TAGTCTAGA
0144    S  S  R  G   R  H  H  H   H  H  H  *
```

GUS-E-VHH: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de GUS-E-VHH**.** Esta fusión consiste en las secuencias de la enzima bacteriana β-glucuronidasa (GUS), el sitio de corte para enteroquinasa (E), y el anticuerpo de simple cadena VHH clon 3B2. Subrayados se indican los sitios NdeI (CATATG), HindIII (AAGCTT) y XbaI (TCTAGA) utilizados para el subclonado y los codones de iniciación y fin de la traducción (en negrita). La secuencia de corte reconocida por la enteroquinasa se encuentra sombreada.

```
0001   CATATGTTACGT CCTGTAGAAACC CCAACCCGTGAA ATCAAAAAACTC GACGGCCTGTGG GCATTCAGTCTG
0001       M  L  R   P  V  E  T   P  T  R  E   I  K  K  L   D  G  L  W   A  F  S  L
0073   GATCGCGAAAAC TGTGGAATTGAT CAGCGTTGGTGG GAAAGCGCGTTA CAAGAAAGCCGG GCAATTGCTGTG
0024    D  R  E  N   C  G  I  D   Q  R  W  W   E  S  A  L   Q  E  S  R   A  I  A  V
0145   CCAGGCAGTTTT AACGATCAGTTC GCCGATGCAGAT ATTCGTAATTAT GCGGGCAACGTC TGGTATCAGCGC
0048    P  G  S  F   N  D  Q  F   A  D  A  D   I  R  N  Y   A  G  N  V   W  Y  Q  R
0217   GAAGTCTTTATA CCGAAAGGTTGG GCAGGCCAGCGT ATCGTGCTGCGT TTCGATGCGGTC ACTCATTACGGC
0072    E  V  F  I   P  K  G  W   A  G  Q  R   I  V  L  R   F  D  A  V   T  H  Y  G
0289   AAAGTGTGGGTC AATAATCAGGAA GTGATGGAGCAT CAGGGCGGCTAT ACGCCATTTGAA GCCGATGTCACG
0096    K  V  W  V   N  N  Q  E   V  M  E  H   Q  G  G  Y   T  P  F  E   A  D  V  T
```

```
0361   CCGTATGTTATT GCCGGGAAAAGT GTACGTATCACC GTTTGTGTGAAC AACGAACTGAAC TGGCAGACTATC
0120    P  Y  V  I   A  G  K  S   V  R  I  T   V  C  V  N   N  E  L  N   W  Q  T  I
0433   CCGCCGGGAATG GTGATTACCGAC GAAAACGGCAAG AAAAAGCAGTCT TACTTCCATGAT TTCTTTAACTAT
0144    P  P  G  M   V  I  T  D   E  N  G  K   K  K  Q  S   Y  F  H  D   F  F  N  Y
0505   GCCGGAATCCAT CGCAGCGTAATG CTCTACACCACG CCGAACACCTGG GTGGACGATATC ACCGTGGTGACG
0168    A  G  I  H   R  S  V  M   L  Y  T  T   P  N  T  W   V  D  D  I   T  V  V  T
0577   CATGTCGCGCAA GACTGTAACCAC GCGTCTGTTGAC TGGCAGGTGGTG GCCAATGGTGAT GTCAGCGTTGAA
0192    H  V  A  Q   D  C  N  H   A  S  V  D   W  Q  V  V   A  N  G  D   V  S  V  E
0649   CTGCGTGATGCG GATCAACAGGTG GTTGCAACTGGA CAAGGCACTAGC GGGACTTTGCAA GTGGTGAATCCG
0216    L  R  D  A   D  Q  Q  V   V  A  T  G   Q  G  T  S   G  T  L  Q   V  V  N  P
0721   CACCTCTGGCAA CCGGGTGAAGGT TATCTCTATGAA CTGTGCGTCACA GCCAAAAGCCAG ACAGAGTGTGAT
0240    H  L  W  Q   P  G  E  G   Y  L  Y  E   L  C  V  T   A  K  S  Q   T  E  C  D
0793   ATCTACCCGCTT CGCGTCGGCATC CGGTCAGTGGCA GTGAAGGGCGAA CAGTTCCTGATT AACCACAAACCG
0264    I  Y  P  L   R  V  G  I   R  S  V  A   V  K  G  E   Q  F  L  I   N  H  K  P
0865   TTCTACTTTACT GGCTTTGGTCGT CATGAAGATGCG GACTTGCGTGGC AAAGGATTCGAT AACGTGCTGATG
0288    F  Y  F  T   G  F  G  R   H  E  D  A   D  L  R  G   K  G  F  D   N  V  L  M
0937   GTGCACGACCAC GCATTAATGGAC TGGATTGGGGCC AACTCCTACCGT ACCTCGCATTAC CCTTACGCTGAA
0312    V  H  D  H   A  L  M  D   W  I  G  A   N  S  Y  R   T  S  H  Y   P  Y  A  E
1009   GAGATGCTCGAC TGGGCAGATGAA CATGGCATCGTG GTGATTGATGAA ACTGCTGCTGTC GGCTTTAACCTC
0336    E  M  L  D   W  A  D  E   H  G  I  V   V  I  D  E   T  A  A  V   G  F  N  L
1081   TCTTTAGGCATT GGTTTCGAAGCG GGCAACAAGCCG AAAGAACTGTAC AGCGAAGAGGCA GTCAACGGGGAA
0360    S  L  G  I   G  F  E  A   G  N  K  P   K  E  L  Y   S  E  E  A   V  N  G  E
1153   ACTCAGCAAGCG CACTTACAGGCG ATTAAAGAGCTG ATAGCGCGTGAC AAAAACCACCCA AGCGTGGTGATG
0384    T  Q  Q  A   H  L  Q  A   I  K  E  L   I  A  R  D   K  N  H  P   S  V  V  M
1225   TGGAGTATTGCC AACGAACCGGAT ACCCGTCCGCAA GGTGCACGGGAA TATTTCGCGCCA CTGGCGGAAGCA
0408    W  S  I  A   N  E  P  D   T  R  P  Q   G  A  R  E   Y  F  A  P   L  A  E  A
1297   ACGCGTAAACTC GACCCGACGCGT CCGATCACCTGC GTCAATGTAATG TTCTGCGACGCT CACACCGATACC
0432    T  R  K  L   D  P  T  R   P  I  T  C   V  N  V  M   F  C  D  A   H  T  D  T
1369   ATCAGCGATCTC TTTGATGTGCTG TGCCTGAACCGT TATTACGGATGG TATGTCCAAAGC GGCGATTTGGAA
0456    I  S  D  L   F  D  V  L   C  L  N  R   Y  Y  G  W   Y  V  Q  S   G  D  L  E
1441   ACGGCAGAGAAG GTACTGGAAAAA GAACTTCTGGCC TGGCAGGAGAAA CTGCATCAGCCG ATTATCATCACC
0480    T  A  E  K   V  L  E  K   E  L  L  A   W  Q  E  K   L  H  Q  P   I  I  I  T
1513   GAATACGGCGTG GATACGTTAGCC GGGCTGCACTCA ATGTACACCGAC ATGTGGAGTGAA GAGTATCAGTGT
0504    E  Y  G  V   D  T  L  A   G  L  H  S   M  Y  T  D   M  W  S  E   E  Y  Q  C
1585   GCATGGCTGGAT ATGTATCACCGC GTCTTTGATCGC GTCAGCGCCGTC GTCGGTGAACAG GTATGGAATTTC
0528    A  W  L  D   M  Y  H  R   V  F  D  R   V  S  A  V   V  G  E  Q   V  W  N  F
1657   GCCGATTTTGCG ACCTCGCAAGGC ATATTGCGCGTT GGCGGTAACAAG AAAGGGATCTTC ACTCGCGACCGC
0552    A  D  F  A   T  S  Q  G   I  L  R  V   G  G  N  K   K  G  I  F   T  R  D  R
1729   AAACCGAAGTCG GCGGCTTTTCTG CTGCAAAAACGC TGGACTGGCATG AACTTCGGTGAA AAACCGCAGCAG
0576    K  P  K  S   A  A  F  L   L  Q  K  R   W  T  G  M   N  F  G  E   K  P  Q  Q
1801   GGAGGCAAACAA GCTTTAGACGAT GACGATAAGATG GCTGATGTGCAG CTGCAGGCGTCT GGGGGAGGTTTG
0600    G  G  K  Q   A  L  D  D   D  D  K  M   A  D  V  Q   L  Q  A  S   G  G  G  L
1873   GCGCAGGCTGGG GACTCTCTGACA CTCTCCTGTGCA GCCTCTGGACGC ACCTTCAGTGGT TATGTCGTGGGC
0624    A  Q  A  G   D  S  L  T   L  S  C  A   A  S  G  R   T  F  S  G   Y  V  V  G
1945   TGGTTCCGCCAG GCTCCAGGGGCG GAGCGTGAGTTT GTAGGAGCTATT AGATGGTCAGAA GATAGCACATGG
0648    W  F  R  Q   A  P  G  A   E  R  E  F   V  G  A  I   R  W  S  E   D  S  T  W
2017   TATGGAGACTCC ATGAAGGGCCGA ATTCTCATCTCC AGAAACAATATC AAGAACACGGTG AATCTGCAAATG
0672    Y  G  D  S   M  K  G  R   I  L  I  S   R  N  N  I   K  N  T  V   N  L  Q  M
2089   TTCAATCTAAAA CCTGAAGACACG GCCGTGTACGTC TGTGCAGCAGGG GCCGGGGATATA GTGACTACTGAG
0720    F  N  L  K   P  E  D  T   A  V  Y  V   C  A  A  G   A  G  D  I   V  T  T  E
2161   ACTTCTTATAAT TACTGGGGCCGG GGGACCCAGGTC ACCGTCTCCTCA CGCGGCCGCCAC CACCATCACCAT
0744    T  S  Y  N   Y  W  G  R   G  T  Q  V   T  V  S  S   R  G   R H   H  H  H  H
2233   CACTAATAGTCT AGA
0768    H  *
```

Oligonucleótidos iniciadores:

Cloro fw: 5’ GTATCTGGGGAATAAGCATCGG 3’

Cloro rv: 5’ CGATGACGCCAACTACCTCTG 3’

NDE5´P1: 5’ GACATATGAGATACTCAAGAAACG 3’

GUS3´: 5’ GGAGAGTTCTAGATTCATTG 3’

GUS5´: 5’ GGAGCTCCGGGAGGTCAGTCCCATATGT 3’

GUS-HindIII: 5’ GTCGTCCCTCCGTTTGTTCGAAATCGATCTAGACC 3’

VP8NdeI: 5’ CCCATATGGCTTCACTCATTTATAGAC 3’

VP8XbaI: 5' CTCTAGATTATCTTGTATATACAATATTCCTTG 3'

HindIII-E-VP8: 5' CCAAGCTTTAGACGATGACGATAAGATGGCTTCACTCATTTATAG 3'

VHHNdeI 5'CCATATGGCTGATGTGCAGC 3'

VHHXbaI 5'CCTCTAGACTATTAGTGATGGTGATG 3'

pepVHHNdeI 5'CCCATATGAAATACCTATTGCCTAC 3'

HindIII-E-VHH 5'CCAAGCTTTAGACGATGACGATAAGATGGCTGATGTGCAG 3'

Metodología del ADN recombinante.

Preparación de ADN plasmídico.

El ADN plasmídico utilizado para analizar colonias recombinantes se preparó mediante el método de lisis alcalina. Se crecieron cultivos de 5 ml a partir de colonias aisladas, y se cosechó 1,5 ml por centrifugación a 600 *g*. El *pellet* se resuspendió en 300 μl de solución 1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA-Na_2 10 mM, ribonucleasa A 100 μg/ml), se agregaron 300 μl de solución 2 (NaOH 200 mM, SDS 1% [m/v]), se mezcló por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Luego se agregaron 300 μl de solución 3 (acetato de potasio 3 M pH 5,5) se mezcló por inversión y se incubó 5 min en hielo. Los tubos se centrifugaron 10 min a 15.000 *g* (4 °C), se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo y se precipitó el ADN agregando 0,6 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó 10 min a 15.000 *g*, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado del precipitado con 500 μl de etanol 70% (v/v). Finalmente, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 30 μl de agua. El ADN plasmídico utilizado para secuenciación, se preparó con el *kit* comercial *Wizard plus SV minipreps DNA purification system* (Promega), según las instrucciones del fabricante. El utilizado para la transformación de cloroplastos de tabaco, fue preparado con el sistema *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN), siguiendo el protocolo sugerido por la empresa.

Reacciones de ligación, cortes con enzimas de restricción y preparación de vectores e insertos.

Las reacciones de ligación y restricción se realizaron con enzimas comerciales de *New England Biolabs*, según los protocolos sugeridos por la empresa. Para las reacciones de PCR se utilizó la enzima *GoTaq DNA polymerase* (Promega). Los fragmentos de ADN a utilizarse como insertos o moldes en reacciones de ligación o marcación -obtenidos de digestiones enzimáticas o reacciones de PCR-, fueron purificados con el *kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). En la preparación de los vectores se procedió del mismo modo.

Transformación genética de cloroplastos de plantas de tabaco.

Se realizó la transformación por biobalística según el método descripto por Svab y Maliga (1993), utilizando el sistema *PDS-1000 / He Particle Delivery System* (BIO-RAD) y el vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr (Wirth y col., 2006). El protocolo incluyó la preparación y recubrimiento con ADN de las micropartículas de oro, el bombardeo de las hojas, la selección de transformantes por cultivo del tejido *in vitro* en presencia de agente selector, y la posterior rusticación de los eventos transplastómicos.

Preparación y recubrimiento de partículas de oro con ADN plasmídico.

Se realizó según el protocolo detallado por Lutz y colaboradores (2006), utilizando micropartículas de oro de 0,6 μm de diámetro (BIO-RAD). Las micropartículas fueron esterilizadas en etanol 70% (v/v), se lavaron con agua estéril y se resuspendieron en glicerol 50% (v/v). Se recubrieron 3 mg de micropartículas con 5 μg de ADN plasmídico, agitando en presencia de $CaCl_2$ 1,25 mM y espermidina 20 mM. Luego se lavaron sucesivamente con etanol 70% (v/v) y 100% (v/v), y se resuspendieron en etanol 100% (v/v).

Bombardeo de hojas.

Se utilizaron hojas jóvenes de plantas de tabaco crecidas *in vitro*. Cada hoja fue bombardeada en su cara abaxial con 0,6 mg de micropartículas recubiertas con ADN. Luego del bombardeo, las hojas se mantuvieron en oscuridad durante 48 hs, en placas de Petri con medio RMOP (sales MS, tiamina 1 mg/L, mio-inositol 100 mg/L, ácido α-naftalenacético 0,1 mg/L, 6-bencilaminopurina 1 mg/L, sacarosa 3% [m/v], agar 0,8% [m/v], MES [ácido 2-{*N*-morfolino} etanosulfónico] 2,5 mM pH 5,75).

Selección de transformantes, cultivo in vitro y rusticación.

Las hojas bombardeadas fueron cortadas en fragmentos de aproximadamente 2x3 cm, eliminando la nervadura central, y cultivadas en placas de Petri conteniendo medio RMOP y espectinomicina 500 mg/L. Se incluyó como control de selección una hoja sin transformar cultivada en las mismas condiciones, y otra cultivada en ausencia de agente selector, como control de regeneración. Los explantos se mantuvieron entre 22 y 28 °C, con un fotoperíodo de 16/8 hs de luz/oscuridad. A partir de las cuatro semanas posteriores al bombardeo se empezaron a observar brotes, que fueron repicados a medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sólido (sales MS, tiamina 1 mg/L, mio-inositol 100 mg/L, sacarosa 3% [m/v], agar 0,8% [m/v], MES [ácido 2-{*N*-morfolino} etanosulfónico] 2,5 mM pH 5,75) conteniendo 500 mg/L de espectinomicina. Las plántulas fueron sometidas a dos rondas adicionales de regeneración en medio RMOP en presencia de espectinomicina 500 mg/L. Se transfirieron a medio sin fitohormonas para el desarrollo de raíces, y luego fueron rusticadas y mantenidas en invernadero con fotoperíodo controlado de 14/10 hs de luz/oscuridad, y temperatura regulada entre 25 y 30 °C. La luz natural fue suplementada con lámparas de sodio, obteniéndose una intensidad de 100-300 $\mu mol\ s^{-1}\ m^{-2}$. Para la rusticación, se eliminaron los restos de medio de las raíces, lavando las mismas con agua, y se plantaron en macetas con una mezcla de 3:1:1

de humus, turba y perlita. Durante la primera semana se mantuvieron las macetas con una cubierta de polietileno para evitar la deshidratación y promover la adaptación de las plántulas a las condiciones de menor humedad. Las semillas obtenidas de plantas transplastómicas autofecundadas se esterilizaron superficialmente con una solución de lavandina comercial al 10% (v/v), y se germinaron en medio MS sólido conteniendo 500 mg/L de espectinomicina, a fin de confirmar la herencia de los transgenes plastídicos.

Análisis de ADN y ARN.

Identificación de plantas transplastómicas mediante PCR.

El ADN utilizado para la identificación por PCR de las plantas transplastómicas se obtuvo empleando el siguiente protocolo: se molieron en un microtubo 50 mg de hoja utilizando un vástago plástico de punta cónica, y se agregaron 350 μl de solución de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA-Na_2 10 mM, NaCl 100 mM, SDS 1% [m/v], 2-mercaptoetanol 10 mM). Se incubó 10 min a 65 °C, se agregó 150 μl de acetato de potasio 3 M pH 5,5 (0 °C), se mezcló por inversión y se incubó 20 min en hielo. Se centrifugó 10 min a 15.000 *g* (4 °C), y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó 1 μl de ribonucleasa A 10 mg/ml y se incubó 10 min a temperatura ambiente. El ADN se precipitó agregando 1 volumen de isopropanol, y centrifugando 10 min a 15.000 *g*. El precipitado se lavó con etanol 80% (v/v), se dejó secar, y se resuspendió en 25 μl de agua.

La reacción de PCR se realizó con 1 μl de la preparación de ADN total, y los oligonucleótidos iniciadores Cloro fw y Cloro rv, que hibridan con el gen plastídico *16S* y el gen selector *aadA*, respectivamente. Los oligonucleótidos iniciadores permiten la amplificación de un fragmento de 1.450 pb sólo en las plantas transplastómicas (Wirth y col., 2006). La reacción de PCR se realizó empleando 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C, en condiciones estándar de concentración de oligonucleótidos iniciadores, dNTPs y $MgCl_2$.

Ensayo de Southern blot.

Se purificó ADN total mediante una modificación del protocolo desarrollado por Dellaporta y colaboradores (1983). Se maceró 1 g de hoja en mortero con nitrógeno líquido, y se agregaron 5 ml de *buffer* CTAB (CTAB [bromuro de hexadecil trimetil amonio] 2% [m/v], NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8, 2-mercaptoetanol 0,2% [v/v]) precalentado a 65 °C. Se trasvasó a un tubo de polipropileno y se incubó 30 min a 65 °C agitando cada 10 min. Luego se agregó un volumen de cloroformo y se agitó con *vortex*. Se centrifugó 10 min a 5.000 *g* (4 °C), la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se repitió la extracción con cloroformo. Se agregó ribonucleasa A hasta una concentración final de 100 μg/ml y se incubó 30 min a 37 °C. Se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol y se mezcló suavemente por inversión. El ADN se

precipitó centrifugando 20 min a 10.000 *g*. El precipitado se lavó con etanol 70% (v/v), se dejó secar, y se resuspendió en 1 ml de agua incubando toda la noche a 4 °C.

Se cortaron entre 2 y 4 μg de ADN total con 10-20 unidades de diferentes enzimas de restricción según el caso, durante 1 h a 37 °C. Se agregó espermidina hasta una concentración final de 1 mM y se continuó el corte toda la noche a 37 °C. El ADN digerido se separó por electroforesis en geles de agarosa 0,8% (m/v) en *buffer* TAE, a 40 mA de corriente constante toda la noche. Luego de la electroforesis los geles se fotografiaron bajo luz UV y se eliminó la calle conteniendo los marcadores de peso molecular. Se lavaron con agua, se depurinizaron incubando con HCl 0,25 M durante 10 min, y se incubaron 20 min con agitación suave en 10 volúmenes de solución desnaturalizante (NaOH 0,4 M, NaCl 1,5 M). El ADN se transfirió por capilaridad con NaOH 0,4 M a membranas de *nylon* cargado *Hybond N+* (GE Healthcare), y se fijó incubando a 80 °C durante 2 h. Las membranas se bloquearon durante 2 hs a 65 °C con 15 ml de solución *Church* (SDS 7% [m/v], BSA 1% [m/v], *buffer* fosfato 0,5 M pH 7,2, EDTA-Na_2 1 mM), en un horno de hibridación rotatorio. Luego se agregó a la solución la sonda desnaturalizada y se incubó toda la noche a 65 °C. Al día siguiente, se descartó la solución con la sonda, se enjuagó la membrana con solución SSC 2X, SDS 0,1% (m/v), y se realizaron cuatro lavados sucesivos de 15 min cada uno con: 1) SSC 2X, SDS 0,1% (m/v) a temperatura ambiente, 2) SSC 2X, SDS 0,1% (m/v) a 65 °C, 3) SSC 0,2X, SDS 0,1% (m/v) a 65 °C, y 4) SSC 0,1X, SDS 0,1% (m/v) a 65 °C (20X SSC: citrato de sodio 300 mM pH 7, NaCl 3 M). Las membranas se revelaron exponiéndolas 3 h a una placa *Fujifilm* BAS-SR (Fuji PHOTO FILM), que fue analizada en un equipo *Storm 820 Phosphorimager System* (Molecular Dynamics).

La sonda utilizada, dirigida contra los genes plastídicos *trn I* y *trn A*, se obtuvo a partir del plásmido pBS16S-23S (Segretin, 2009) por corte con las enzimas BamH I y Bgl II. El marcado radioactivo con [α-^{32}P] dCTP y la purificación de la sonda marcada se realizó con el *kit Prime-a-gene* (Promega), y la columna *MicroSpin* HR200 (Amersham Biosciences) respectivamente, según las indicaciones de los fabricantes.

Ensayo de northern blot.

Se purificó ARN total de hojas homogeneizando 200 mg de tejido fresco en mortero con nitrógeno líquido. Se agregó 1 ml de TRIzol (Invitrogen), y se incubó 5 min a temperatura ambiente en un microtubo; se agregaron 0,2 ml de cloroformo, se agitó 15 s con *vortex* vigorosamente, y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 15 min a 15.000 *g* (4 °C), y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. El ARN se precipitó agregando 0,5 ml de isopropanol e incubando 10 min a temperatura ambiente, seguidos de una centrifugación a 15.000 *g* por 10 min (4 °C). El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 75% (v/v), se dejó secar, y se resuspendió en 50 μl de agua.

Se utilizaron entre 5 y 10 μg de ARN total de cada muestra por calle según el caso. El ARN se incubó con *buffer* MOPS (MOPS [ácido 3-{N-morfolino}propanosulfónico] 0,02 M pH 7, acetato de sodio 5 mM, EDTA-Na_2 1 mM) conteniendo formaldehído 6,7% (v/v) y formamida 50% (v/v) a 65 °C durante 10 min, seguidos de 2 min en hielo. Luego se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 μg/ml y *buffer* de siembra 10X (glicerol 50% [v/v], azul de bromofenol 0,25% [m/v], EDTA-Na_2 100 mM pH 8), ambos libres de ribonucleasas. Las muestras se sembraron en geles desnaturalizantes (agarosa 1,5% [m/v], formaldehído 6,7% [v/v], en *buffer* MOPS), y la electroforesis se realizó a 65 V constantes en *buffer* MOPS conteniendo formaldehído 6,7% [v/v]. Los morteros utilizados en la extracción y la cuba de electroforesis, fueron lavados previamente con una solución de SDS 1% (m/v), y enjuagados con agua destilada estéril.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron fotografiados bajo luz UV, y transferidos por capilaridad a membranas de *nylon* cargado *Hybond N+* (*GE Healthcare*) utilizando como *buffer* de transferencia SSC 20X. El ARN se fijó a las membranas por incubación a 80 °C durante 2 hs.

El marcado y purificación de las sondas y el revelado de las membranas, se realizó siguiendo los protocolos descriptos anteriormente para el ensayo de *Southern blot*. Como molde para las sondas utilizadas en los ensayos de *northern blot*, se utilizaron los fragmentos obtenidos por restricción NdeI y XbaI a partir de las construcciones pZErO-2/VP-*β*GUS, pZErO-2/VP8* y pZErO-2/VHH.

El trabajo con material radioactivo se realizó en un cuarto aislado destinado a tal fin, de acuerdo a las normativas establecidas por el Ente Regulador de la Energía Atómica.

Análisis de proteínas.

Extractos totales de proteínas de hojas de plantas de tabaco y de cultivos bacterianos.

Se maceraron con un vástago plástico de punta cónica 25 mg de hoja en un microtubo, y se agregaron 125 μl de *buffer* Laemmli (1970). Se calentó la muestra 10 min a 100 °C, y se centrifugó 10 min a 15.000 *g*. Se trasvasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se repitió la centrifugación. Según el ensayo, se sembraron entre 10 y 20 μl de extracto, correspondientes a proteínas totales obtenidas a partir de 2 y 4 mg de tejido fresco inicial, respectivamente. Para los cultivos bacterianos se realizó la misma extracción, utilizando como material inicial el *pellet* obtenido a partir de 1 ml de cultivo resuspendidos en 100 μl de *buffer* Laemmi, y se sembraron 10 μl del extracto.

Análisis de la solubilidad de la proteína recombinante en plantas que expresan VP8 y VHH.*

Se homogeneizaron en mortero con nitrógeno líquido 0,2 g de hoja, se agregó 1 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 30 mM, y se centrifugó 15 min a 10.000 *g* (4 °C). Se separó el sobrenadante del *pellet*, este último fue lavado con 1 ml de agua (0 °C), y se procesaron muestras de cada fracción con *buffer* Laemmi para sembrar en los geles proteínas provenientes de 4 mg de tejido fresco inicial.

Protocolo de extracción de la proteína VP8.*

La proteína VP8 forma agregados insolubles en las plantas transplastómicas, y para su solubilización se adaptó un protocolo publicado por Peternel y colaboradores (2008), en el cual utilizan agentes no desnaturalizantes para la extracción de proteínas que forman cuerpos de inclusión en *E. coli*. Se maceraron en mortero con nitrógeno líquido 0,2 g de hoja, se agregó 1 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 30 mM, y se sonicó 3 veces por 15 s con el sistema *Heat System-Ultrasonic* (50% ciclo, potencia 5). Se centrifugó 15 min a 10.000 *g* (4 °C), se tomó el sobrenadante (S1) y se lo almacenó a -20 °C. El pellet (P1) se lavó con 1 ml de agua (0 °C), y se resuspendió en 1,5 ml de Tris-HCl 40 mM pH 8, N-lauroyl sarcosine 0,2% (m/v), y se incubó en agitación a 26 °C por 24 h. Luego se centrifugó por 15 min a 4.400 *g* a temperatura ambiente para obtener el sobrenadante (S2) y el pellet (P2). Se procesaron muestras de cada fraccion con *buffer* Laemmli para sembrar en los geles proteínas provenientes de 4 mg de tejido fresco inicial.

Fraccionamiento subcelular para el estudio de la localización de las proteínas recombinantes en cloroplastos de plantas transplastómicas que expresan VP8 y VHH.*

Se empleó un protocolo basado en el utilizado por Tissot y colaboradores (2008), que a su vez es una adaptación del trabajo original en el cual se caracterizaron proteínas del lumen del cloroplasto (Kieselbach y col., 1998). En todas las fracciones se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (1976) y la concentración de clorofila total por el método de Porra y colaboradores (1989). Se indica en el protocolo entre paréntesis en *itálica y* subrayado las distintas fracciones obtenidas para las cuales se hicieron las mediciones mencionadas.

Se licuaron 100 g de hoja de tabaco (sin nervadura central) por 10 s en 400 ml de sorbitol 330 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, BSA 0,15 % (m/v), ascorbato de sodio 4 mM, 2-mercaptoetanol 0,2% (v/v), HEPES–KOH 50 mM pH 7,8. El licuado se filtró por 4 capas de malla de *nylon* de 20 μm (*fracción "inicial"*), y fue centrifugado 2 min a 1.000 *g* (4 °C). El *pellet* se resuspendió suavemente en 200 ml de sorbitol 330 mM, HEPES–KOH 50 mM pH 7,8, KCl 10 mM, y se centrifugó 2 min a 1.000 *g* (4 °C). Se descartó el sobrenadante y los cloroplastos (*pellet*) fueron resuspendidos suavemente en 10 ml del mismo *buffer* (*fracción "cloroplastos"*). Luego se

centrifugaron 2 min a 1.000 *g* (4 °C), se descartó el sobrenadante, y fueron lisados resuspendiéndolos suavemente en *buffer* pirofosfato de sodio 10 mM pH 7,8, a una concentración final de 0,2 mg/ml de clorofila total. En el caso de las plantas pep-VHH, se utilizaron solo 27 g de hojas debido a la falta de material por la baja tasa de crecimiento de las plantas (las hojas provenían de plantas rusticadas y plantas crecidas *in vitro*).

Se separó el estroma de los tilacoides por centrifugación 5 min a 7.500 *g* (4 °C). Este sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 10 min a 20.000 *g* (4 °C) y concentrado por liofilización (*fracción "estroma"*). Los tilacoides (*pellet*) fueron lavados dos veces de modo secuencial con 20 ml de los siguientes *buffers*: 1) pirofosfato de sodio 10 mM pH 7,8; 2) sacarosa 300 mM, Tricina 2 mM pH 7,8; 3) NaCl 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, sacarosa 100 mM, fosfato de sodio 30 mM pH 7,8. Los tilacoides se resuspendieron en 1,25 ml de este último *buffer* (concentración final entre 3,5 y 4,5 mg/ml de clorofila total) (*fracción "tilacoides"*).

Para liberar el contenido lumenal, los tilacoides fueron sonicados mediante 3 pulsos de 10 s utilizando el sistema *Heat System-Ultrasonic* (50% ciclo, potencia 5) y manteniendo las muestras en hielo. Luego se separó el lumen de las membranas tilacoidales por centrifugación durante 10 min a 16.000 *g* (4 °C). El sobrenadante (lumen) se volvió a centrifugar 10 min a 20.000 *g* (4 °C) para eliminar los restos de membranas (*fracción "lumen"*). La fracción de membranas se lavó dos veces para eliminar restos de proteínas lumenales, resuspendiendo en 1 ml de NaCl 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, sacarosa 100 mM, fosfato de sodio 30 mM pH 7,8, y centrifugando durante 10 min a 16.000 *g* (4 °C). Finalmente fueron resuspendidas en 1 ml del mismo *buffer* utilizado en los lavados (*fracción "membranas"*).

La medición de clorofila total se realizó por espectrofotometría UV de acuerdo al protocolo de Porra y colaboradores (1989). Se agregaron 20 μl del preparado a 10 ml de una solución de acetona al 80% (v/v), y se vortexeó durante 1 min. Se trasvasó 1 ml del extracto y se centrifugó 5 min a 13.000 *g*. El sobrenadante se utilizó para medir la absorbancia a 646, 663 y 750 nm en una cubeta de cuarzo. La concentración de clorofila total (a+b) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$[Chla+b]\ (\mu g/ml) = (17{,}76 * (A_{663} - A_{750}) + 7{,}34 * (A_{646} - A_{750})) * 500$$

Ensayo de SDS-PAGE y western blot.

Se utilizó el sistema *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (BIO-RAD) para la preparación y electroforesis de minigeles de poliacrilamida de 1,5 mm de espesor, a 20 mA constantes en *buffer* TGS (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1% [m/v]). Se siguieron los protocolos detallados por Sambrook y colaboradores (1989). La tinción con *Coomasie Brilliant Blue* se realizó incubando los geles en agitación toda la noche en solución de teñido (*Coomasie Brilliant Blue* R-250 0,05% [m/v], metanol 40% [v/v], ácido acétido 10% [v/v]). Se destiñeron realizando dos incubaciones en solución desteñidora 1 (metanol 50% [v/v], ácido acético 10% [v/v]), seguidas de tres incubaciones en solución desteñidora 2 (metanol 7,5% [v/v], ácido acético 7,5% [v/v]), y

una última incubación en agua. Todas las incubaciones se hicieron durante 30 min con agitación a temperatura ambiente.

Para la inmunodetección, se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa *Hybond ECL* (GE Healthcare) utilizando el sistema *Mini Trans-Blot* (BIO-RAD). La transferencia se llevó a cabo a 100 V constantes durante 1 h (0 °C), con *buffer* de transferencia Tris-HCl 50 mM pH 7,5, glicina 196 mM, metanol 20% (v/v). Las membranas fueron teñidas con solución de rojo *Ponceau* (ácido carmínico 0,2% [m/v], ácido acético 5% [v/v]) para evaluar la eficiencia de transferencia, y luego bloqueadas durante 1 h con solución de bloqueo (*buffer* TBS [Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM], con leche descremada en polvo 5% [m/v] y Tween-20 0,05% [v/v]). La inmunodetección se realizó por incubación de las membranas bloqueadas con el primer anticuerpo o suero diluido en solución de bloqueo durante 1 h, seguida de cuatro lavados de 5 min con *buffer* T-TBS (*buffer* TBS, Tween-20 0,05% [v/v]). Luego se incubó 1 h con una anti-IgG de ratón o conejo según el caso, marcado con fosfatasa alcalina (Cell Signaling Technology), diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Se realizaron 2 lavados de 5 min con T-TBS, uno con TBS, y un cuarto lavado con *buffer* fosfatasa (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM). Todas las incubaciones se realizaron con agitación a temperatura ambiente. El revelado se realizó en *buffer* fosfatasa conteniendo NBT (cloruro de 2,2'-Di-p-nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'[3,3'-dimetoxi-4,4'-difenilen]-ditetrazolium) 0,3 mg/ml y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato) 0,15 mg/ml, hasta la aparición de bandas. El revelado se frenó descartando la solución de revelado e incubando las membranas en agua.

Los anticuerpos y sueros utilizados se indican a continuación:

- Suero de ratón contra el epítope incluído en los aminoácidos 135-160 de VP1 del virus de la fiebre aftosa (Dus Santos y col., 2002).

- Suero de ratón contra VP8* de rotavirus bovino (Mozgovoj, 2008).

- Suero de conejo contra VHH (Laboratorio del Dr. Andrés Wigdorovitz, INTA-Castelar).

- Anticuerpo anti-His monoclonal (GE Healthcare).

- Sueros de conejo contra la subunidad mayor de RuBisCO y contra plastocianina (Dr. Néstor Carrillo, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Universidad Nacional de Rosario).

Ensayo de actividad β-glucuronidasa.

Este ensayo cualitativo se realizó para cultivos bacterianos y hojas de plantas transplastómicas. La solución de revelado, de acuerdo al protocolo desarrollado por McCabe y colaboradores (1988), consistió en NaH_2PO_4 100 mM pH 7, $K_4Fe(CN)_6$ 0,5 mM, EDTA-Na_2 10 mM, Triton X-100 0,1% (v/v), X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-glucurónico) 1 mM. Se resuspendió el *pellet* obtenido a partir de 1 ml de cultivo bacteriano en 1 ml de la solución

de revelado y se incubó 30 min a 37 °C. Para las plantas, se utilizó un fragmento de hoja de aproximadamente 2x3 cm, que fue incubado durante 30 min en solución de revelado a 37 °C.

Ensayo fluorométrico de actividad β-glucuronidasa.

Se utilizó el método descripto por Jefferson y colaboradores (1987). Se maceraron 25 mg de hoja con vástago plástico de punta cónica en un microtubo, y se agregaron 125 μl *buffer* de extracción GUS (*buffer* fosfato 50 mM pH 7, EDTA-Na_2 10 mM, N-lauryl sarcosine 0,1% [m/v], Triton X-100 0,1% [v/v], 2-mercaptoetanol 10 mM, PMSF [fenil metanosulfonil fluoruro] 1 mM). Luego de centrifugar 30 min a 12.000 *g* (4 °C), se tomó el sobrenadante y se diluyó 1:10 para las plantas *wild-type* y transgénicas nucleares, y 1:1.000.000 para las transplastómicas. Esta mayor dilución de los extractos de plantas transplastómicas fue necesaria para obtener una fluorescencia dentro un rango de medición confiable. Se utilizaron 2 μl de las diluciones con 498 μl de *buffer* de reacción (*buffer* de extracción GUS conteniendo 4-metilumbelliferyl-β-D-glucurónico [Invitrogen] 1 mM), y se incubaron los tubos a 37 °C. Se tomaron alícuotas de 100 μl a tiempo 0, y a los 10, 20 y 30 min de comenzada la reacción, y se transfirieron a tubos conteniendo 1,9 ml de *buffer stop* (Na_2CO_3 0,1 M). Se determinó la fluorescencia en las muestras utilizando el fluorómetro *DyNAQuant 200* (Hoëfer), y se realizó la conversión entre unidades de fluorescencia y nmoles de 4-MU (4-metil-umbeliferona) con una curva de calibración construida con un estándar de 4-MU (Invitrogen). La concentración de proteínas totales se determinó mediante el ensayo de Bradford (1976). Este ensayo fluorométrico se repitió al menos dos veces para cada planta, obteniéndose resultados similares.

Cuantificación de la acumulación de VP-βGUS, y VP8 por SDS-PAGE.*

Se prepararon extractos proteicos totales de las distintas hojas: se maceraron 0,2 g de tejido fresco en mortero con nitrógeno líquido, se agregó 1 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 30 mM, y se sonicó 3 veces por 15 s con el sistema *Heat System-Ultrasonic*. Se centrifugó 15 min a 10.000 *g* (4 °C), y se tomó el sobrenadante. Se determinaron las proteínas solubles totales por el método de Bradford (1976), y se sembraron entre 2 y 40 μg de los extractos proteicos, en paralelo con distintas cantidades de albúmina sérica bovina (BSA) como estándar de masa. Los geles de poliacrilamida fueron teñidos con *Coomasie Brilliant Blue*, y las bandas correspondientes a VP-βGUS, VP8* y BSA fueron analizadas por densitometría con el programa Image J (NIH, http://rsbweb.nih.gov/ij). Se expresó la acumulación en función de la masa que representaba la proteína recombinante respecto de las proteínas solubles totales (% PST), y también como masa de proteína recombinante obtenida a partir de masa de tejido fresco o seco (mg/g T).

Cuantificación de la acumulación VP-βGUS, GUS-E-VHH y VHH por western blot.

Se sembraron distintas cantidades del extracto proteico de hoja, y del virus de la fiebre aftosa (VFA) purificado, siguiendo la misma metodología aplicada para el análisis de plantas de alfalfa transgénicas que expresaban VP-βGUS (Dus Santos y col., 2002). En la inmunodetección se utilizó un suero de ratón contra el epítope incluído en los aminoácidos 135-160 de VP1 de VFA. Las bandas reveladas fueron analizadas con el programa Image J (NIH, http://rsbweb.nih.gov/ij), y para los cálculos se consideró que el virión de VFA (Mr = $7x10^3$ kDa) contiene 60 copias de VP1 y consecuentemente 60 copias del péptido p135-160 (Mr = 2,8 kDa) (Bachrach, 1977; Sobrino y col., 2001). La banda de VP-βGUS en la calle conteniendo 1,25 μg de extracto total mostró una intensidad consistente con la presencia de 25 ng del péptido p135-160, y consecuentemente 644 ng de VP-βGUS (Mr = 72,5 kDa). Esta masa de proteína recombinante representaba el 51% de las proteínas solubles totales de la hoja.

Para las plantas GUS-E-VHH y pep-VHH la cuantificación se realizó siguiendo la misma metodología descripta anteriormente, e incluyendo en el análisis distintas hojas de una misma planta. Se utilizó en la inmunodetección suero de conejo contra VHH y como curva de calibración cantidades conocidas de VHH 3B2 purificada, producida en *E. coli* (Garaicoechea y col., 2008).

Cuantificación de la acumulación de VP8 por ELISA.*

Las determinaciones por ELISA de VP8* en las fracciones S1 y P2 obtenidas según se indica en "*protocolo de extracción de la proteína VP8**" fueron realizadas por la Dra. Marina Mozgovoj, utilizando un protocolo desarrollado en su Tesis Doctoral (Mozgovoj, 2008). El ensayo consistió en utilizar un suero de conejo anti-VP8* inmobilizado en la placa de ELISA para capturar VP8* de las muestras, y su detección por incubación con un suero de ratón anti-VP8* y un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa. La reacción se reveló con el sustrato ABTS (ácido 2,2' azino bis 3-etil benzil-thiazonil-6-sulfónico) en presencia de peróxido de hidrógeno y se registraron los valores de absorbancia a 405 nm. Para determinar la concentración de antígeno en las muestras analizadas se incluyó una curva de VP8* purificada producida en *E. coli*. Las preparaciones analizadas por ELISA fueron las mismas que se utilizaron posteriormente en las inmunizaciones.

Inmunización de ratones con extractos de plantas VP-βGUS y análisis de la respuesta inmune.

La inmunización de ratones y el análisis de sus sueros por ELISA en el ensayo preliminar y su repetición, estuvieron a cargo del Dr. Wigdorovitz y la Dra. Marina Mozgovoj, respectivamente (Instituto de Virología, CICV y A. INTA-Castelar). En el estudio preliminar, los extractos de hojas de plantas VP-βGUS y βGUS (control negativo) se realizaron en *buffer* de extracción GUS, como fue descripto en "*ensayo fluorométrico de actividad β-glucuronidasa*". Estos

extractos fueron analizados por SDS-PAGE y *Western blot*, y posteriormente utilizados para la inmunización. Se inocularon ratones BALB/C en los días 0 y 21 con 31 μg de proteínas solubles totales de plantas transplastómicas en adjuvante oleoso, y los sueros fueron analizados a los 30 días de la primer inoculación. Para el segundo ensayo se utilizó un número mayor de animales, y los extractos proteicos de plantas VP-βGUS y *wild-type* (control negativo) fueron preparados según se detalló en "*Cuantificación de la acumulación VP-βGUS por SDS-PAGE*". Estos extractos fueron analizados por SDS-PAGE, y se cuantificó la proteína recombinante por densitometría utilizando el programa Image J (NIH, http://rsbweb.nih.gov/ij). Los ratones fueron inoculados en los días 0 y 30 con 67 μg de proteínas solubles totales en adjuvante oleoso, y sus sueros fueron analizados a los 45 días de la primera inoculación. En este ensayo se incluyó como control positivo un ratón inoculado con la vacuna anti-aftosa comercial Bioaftogen (Biogénesis-Bagó).

Los sueros fueron analizados por ELISA para detectar anticuerpos contra el péptido p135-160 de VP1 de VFA, utilizando el péptido sintético como antígeno (Wigdorovitz y col., 1999). Se confirmó la presencia de anticuerpos específicos en los ratones inoculados con extracto de plantas VP-βGUS, mediante *Western blot*. Las muestras analizadas fueron extractos proteicos de *E. coli* recombinantes que expresaban VP-βGUS y βGUS, y VFA purificado. Para la detección se utilizó una dilución 1:20 en solución de bloqueo, de un *pool* de sueros de los ratones inoculados.

Estudio de la inmunogenicidad y protección brindada por plantas transplastómicas VP8 en el modelo del ratón lactante.*

La inmunización, y la evaluación de la inmunogenicidad y protección en el modelo del ratón lactante estuvieron a cargo de la Dra. Marina Mozgovoj y el Lic. Demian Bellido (Instituto de Virología, CICV y A. INTA-Castelar). Se siguió el esquema experimental indicado en la figura 38. Se inmunizaron ratones BALB/C hembras vía intraperitoneal con dos dosis de extractos de plantas VP8* conteniendo 2 μg de proteína recombinante, preparada con adjuvante Marcol/Arlacel (Biogénesis-Bagó). Se utilizó la fracción soluble S1 y la fracción insoluble P2, obtenida según se indica en "*Protocolo de extracción de VP8*".* Luego de 4 semanas las hembras fueron apareadas y sus crías fueron desafiadas al 5to día de vida con 105 unidades fluorescentes (FFU) de rotavirus bovino, administradas por vía intragástrica. Esta dosis provocó diarrea en el 100% de las crías control no inmunizadas. Se monitoreó a las 24, 48 y 72 hs la aparición de diarrea (Ijaz y col., 1987), y luego de 10 días del desafío se obtuvo el suero de las crías.

La determinación de anticuerpos anti-VP8* en los sueros de ratones hembras y sus crías fue realizada de acuerdo al protocolo descripto por Bellido y colaboradores (2009). Se utilizaron placas de ELISA sensibilizadas con VP8* producida en *E. coli*, las cuales fueron incubadas con los sueros diluidos en solución de bloqueo y posteriormente con un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa. La reacción se reveló con el sustrato ABTS en presencia de

peróxido de hidrógeno y se registraron los valores de absorbancia a 405 nm. Los títulos se expresaron como $\log_{10}$ de la recíproca de la máxima dilución en la cual se obtenía un valor mayor al promedio de las muestras negativas más dos desviaciones estándar.

Para la determinación de anticuerpos neutralizantes se utilizó el ensayo de neutralización de focos fluorescentes, de acuerdo al protocolo descripto por Tô y colaboradores (1998). Para esto se incubaron 100 FFU de rotavirus bovino con diluciones seriadas de los sueros estudiados y posteriormente se evaluó la capacidad del virus para replicar en células MA-104. Se reveló el virus con un anticuerpo anti-rotavirus acoplado a isotiocianato de fluoresceína. Los títulos se expresaron como el $\log_{10}$ de la recíproca de la máxima dilución que permitía una reducción mayor al 80% de los focos fluorescentes.

Los ratones utilizados provinieron del Bioterio de CICV y A (INTA-Castelar), y se confirmó antes de los ensayos la ausencia de anticuerpos contra rotavirus por ELISA. El manejo de los animales, las inmunizaciones, la toma de muestras y desafío se realizaron bajo la supervisión de un veterinario y de acuerdo a los protocolos aprobados por el comité ético de bienestar animal del INTA.

Medición de nicotina.

Se empleó una adaptación del protocolo utilizado por Shi y colaboradores (2006), basado en el método de medición por UV (Willits y col., 1950). Se realizó una extracción a partir de 4 g de tejido fresco en 60 ml de una solución de NaOH 10% (m/v) a 100 °C. Se obtuvo el destilado, y se agregó agua a la solución de nicotina hasta un volumen de 100 ml. Se realizaron mediciones a 236, 259 y 282 nm usando un espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). El contenido de nicotina de las fracciones S1, S2 y P2 se determinó de la misma manera, utilizando extractos solubles o insolubles obtenidos a partir de 4 g de tejido fresco.

Las cuantificaciones de nicotina en tejido seco se realizaron siguiendo el mismo protocolo, y para las mediciones con el espectrofotómetro se utilizaron diluciones 1:10 de los distintos destilados. La concentración de nicotina se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

$$D'_{259} = 1{,}059 * [F * A_{259} - 0{,}5 * (A_{236} + A_{282})]$$

$$c\ (mg/ml) = D'_{259} / 34{,}4$$

F: factor de dilución; c: concentración de nicotina.

Tratamiento de GUS-E-VHH con enteroquinasa.

Se realizó un extracto proteico a partir de hojas frescas de una planta GUS-E-VHH en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ mM, utilizando 5 ml de *buffer* por cada gramo de tejido. Se homogeneizó el material en nitrógeno líquido y se agregó el *buffer*. El homogenato se centrifugó 10 min a 14.000 *g* (4 °C), y se obtuvo el sobrenadante. Alícuotas de 20 μg de

proteínas totales se trataron con cantidades crecientes de enteroquinasa comercial 50 μg/ml, por 24 h a 37 °C. Las muestras se analizaron luego por *western blot*.

Secado de plantas transplastómicas VP8.*

Plantas de aproximadamente 3 meses de edad fueron secadas mediante dos procedimientos. El primero consistió simplemente en eliminar el riego y para el segundo se cortaron las plantas por la base eliminando las raíces y se colgaron como se indica en la figura 44a. En ambos casos las plantas fueron mantenidas dentro del invernadero, durante 5 semanas.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Ahlert D, Ruf S, Bock R (2003) Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. Proc Natl Acad Sci U S A 100(26):15730-15735.

Aldridge C, Cain P, Robinson C (2009) Protein transport in organelles: Protein transport into and across the thylakoid membrane. FEBS J 276(5):1177-86.

Andrés I, Rodríguez-Díaz J, Buesa J, Zueco J (2006) Yeast expression of the VP8* fragment of the rotavirus spike protein and its use as immunogen in mice. Biotechnol Bioeng 93(1):89-98.

Apel W, Schulze WX, Bock R (2010) Identification of protein stability determinants in chloroplasts. Plant J. 2010 Jun 7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20545891.

Bachrach H (1977) Foot and mouth disease virus: properties, molecular biology and immunogenicity. In: Romberger, Betsville Symposia in Agricultural Research I. Virology in Agriculture, 3-32. Ed. Allanheld-Osmiun, Montclair, NY.

Bally J, Paget E, Droux M, Job C, Job D, Dubald M (2008) Both the stroma and thylakoid lumen of tobacco chloroplasts are competent for the formation of disulphide bonds in recombinant proteins. Plant Biotechnol J 6(1):46-61.

Bally J, Nadai M, Vitel M, Rolland A, Dumain R, Dubald M (2009) Plant physiological adaptations to the massive foreign protein synthesis occurring in recombinant chloroplasts. Plant Physiol 150(3):1474-81.

Bellido D, Craig PO, Mozgovoj MV, Gonzalez DD, Wigdorovitz A, Goldbaum FA, Dus Santos MJ (2009) *Brucella* spp. lumazine synthase as a bovine rotavirus antigen delivery system. Vaccine 27(1):136-45.

Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH (1988) *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment (1988) Science 240(4855):1041-1043.

Birch-Machin I, Newell CA, Hibberd JM, Gray JC (2004) Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability. Plant Biotechnol J 2(3):261-270.

Bock R, Khan MS (2004) Taming plastids for a green future. Trends Biotechnol 22(6):311-318.

Bock R (2007) Plastid biotechnology: prospect for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. Curr Opin Biotechnol 18:100-106.

Bock R, Warzecha H (2010) Solar-powered factories for new vaccines and antibiotics. Trends Biotechnol 28(5):246-252.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.

Brown F (1992) New approaches to vaccination against foot-and-mouth disease. Vaccine 10(14):1022-1026.

Brown F (2003) New approaches to vaccination against foot-and-mouth disease. Virus Res 91(1):3-7.

Bruick RK, Mayfield SP (1999) Light-activated translation of chloroplast mRNAs. Trends Plant Sci 4(5):190-195.

Buchanan BB, Luan S (2005) Redox regulation in the chloroplast thylakoid lumen: a new frontier in photosynthesis research. J Exp Bot 56(416):1439-1447.

Chassin Y, Kapri-Pardes E, Sinvany G, Arad T, Adam Z (2002) Expression and characterization of the thylakoid lumen protease DegP1 from Arabidopsis. Plant Physiol 130(2):857-864.

Chebolu S, Daniell H (2007) Stable expression of Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis. Plant Biotechnol J 5:230–239.

Chen P, Wang C, Soong S, To K (2003) Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Mol Breeding 11:287-293.

Chen JZ, Settembre EC, Aoki ST, Zhang X, Bellamy AR, Dormitzer PR, Harrison SC, Grigorieffab N (2009) Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. Proc Natl Acad Sci USA. 106(26):10644–10648.

Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 81:1991-1995.

Conrath KE, Lauwereys M, Galleni M, Matagne A, Frère JM, Kinne J, Wyns L, Muyldermans S (2001) Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. Antimicrob Agents Chemother 45(10):2807-2812.

Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO (2001) Expression of cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. J Mol Biol 311:1001–1009.

Daniell H, Khan MS, Allison L (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. Trends Plant Sci 7(2):84-91.

Daniell H (2006) Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. Biotechnol J 1:1071–1079.

Daniell H, Singh ND, Mason H, Streatfield SJ (2009a) Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. Trends Plant Sci 14(12):669-679.

Daniell H, Ruiz G, Denes B, Sandberg L, Langridge W (2009b) Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function. BMC Biotechnol 9:33.

Davies HM (2005) "Plant-made pharmaceuticals: an overview and update." En: Agricultural Biotechnology: Beyond Food and Energy to Health and the Environment. National Agricultural Biotechnology Council Report 17. Eaglesham

A, Bessin R, Trigiano R, Hardy RWF (eds). Ithaca. New York, USA: 59-70.

Davies HM (2010) Commercialization of whole-plant systems for biomanufacturing of protein: evolution and prospects. Plant Biotecnol J 8:845-861.

Decanniere K, Muyldermans S, Wyns L (2000) Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes? J Mol Biol 300(1):83-91.

De Cosa B, Moar W, Lee S, Miller M, Daniell H (2001) Overexpression of the *Bt* cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. Nat Biotechnol 19:71-74.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reports 1:19-21.

Dellaporta SL, Chomet PS, Mottinger JP, Wood JA, Yu SM, Hicks JB (1984) Endogenous transposable elements associated with virus infection in maize. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 49:321-328.

Deng XW, Gruissem W (1987) Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. Cell 49(3):379-387.

Dus Santos (2001) Expresión de antígenos del virus de la fiebre aftosa en plantas de alfalfa transgénicas: su utilización como inmunógenos experimentales. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Dus Santos MJ, Wigdorovitz A, Trono K, Ríos RD, Franzone PM, Gil F, Moreno J, Carrillo C, Escribano JM, Borca MV (2002) A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants. Vaccine 20:1141-1147.

Dus Santos MJ, Carrillo C, Ardila F, Ríos RD, Franzone P, Piccone ME, Wigdorovitz A, Borca MV (2005) Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen. Vaccine. 23(15):1838-1843.

Esposito D, Hicks AJ, Stern DB (2001) A role for initiation codon context in chloroplast translation. Plant Cell 13(10):2373-2384.

Esposito D, Fey JP, Eberhard S, Hicks AJ, Stern DB (2003) *In vivo* evidence for the prokaryotic model of extended codon-anticodon interaction in translation initiation. EMBO J 22(3):651-656.

Fagard M, Vaucheret H (2000) (TRANS)GENE SILENCING IN PLANTS: How Many Mechanisms? Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 51:167-194.

Fernández-San Millán A, Mingo-Castel A, Miller M, Daniell H (2003) A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. Plant Biotechnol J 1(2):71-79.

Fernández-San Millan A, Ortigosa SM, Hervas-Stubbs S, Corral-Martinez P, Segui-Simarro JM, Gaetan J, Coursaget P, Veramendi J (2008) Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. Plant Biotechnol J 6:427–441.

Floss DM, Falkenburg D, Conrad U (2007) Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. Trans Res 16:315-332.

Frenken LG, van der Linden RH, Hermans PW, Bos JW, Ruuls RC, de Geus B, Verrips CT (2000) Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. J Biotechnol 78(1):11-21.

Garaicoechea L, Bok K, Jones LR, Combessies G, Odeón A, Fernandez F, Parreño V (2006) Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). Vet Microbiol 118(1-2):1-11.

Garaicoechea L, Olichon A, Marcoppido G, Wigdorovitz A, Mozgovoj M, Saif L, Surrey T, Parreño V (2008) Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 protein possess broad neutralizing activity *in vitro* and confer protection against diarrhea in mice. J Virol 82(19):9753-9764.

Ghahroudi AM, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. FEBS Lett 414(3):521-526.

Giddings G (2001) Transgenic plants as protein factories. Curr Opin Biotechnol 12(5):450-454.

Giglione C, Vallon O, Meinnel T. Control of protein life-span by N-terminal methionine excision. EMBO J. 2003 Jan 2;22(1):13-23.

Gil MT, de Souza CO, Asensi M, Buesa J (2000) Homotypic protection against rotavirus-induced diarrhea in infant mice breast-fed by dams immunized with the recombinant VP8* subunit of the VP4 capsid protein. Viral Immunol 13(2):187-200.

Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2005) Magnifection--a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. Vaccine 23(17-18):2042-2048.

Gomord V, Fitchette AC, Menu-Bouaouiche L, Saint-Jore-Dupas C, Plasson C, Michaud D, Faye L (2010) Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. Plant Biotechnol J 8(5):564-587.

Gray BN, Ahner BA, Hanson MR (2009a) High-level bacterial cellulase accumulation in chloroplast-transformed tobacco mediated by downstream box fusions. Biotechnol Bioeng 102(4):1045-1054.

Gray BN, Ahner BA, Hanson MR (2009b) Extensive homologous recombination between introduced and native regulatory plastid DNA elements in transplastomic plants. Transgenic Res 18(4):559-572.

Grubman MJ, Baxt B (2004) Foot-and-mouth disease. Dis Clin Microbiol Rev 17:465-493.

Hager M, Biehler K, Illerhaus J, Ruf S, Bock R (1999) Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome b(6)f complex. EMBO J 18(21):5834-5842.

Harmsen MM, De Haard HJ (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl Microbiol Biotechnol 77(1):13-22.

Herz S, Füßl M, Steiger S, Koop H (2005) Development of novel types of plastid transformation vectors and evaluation of factors controlling expression. Trans Res 14:969-982.

Hondred D, Walker JM, Mathews DE, Vierstra RD (1999) Use of ubiquitin fusions to augment protein expression in transgenic plants. Plant Physiol 119:713-723.

Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Nucleic Acids Res. 19(15):4133-4137.

Ijaz MK, Sabara MI, Frenchick PJ, Babiuk LA (1987) Effect of different routes of immunization with bovine rotavirus on lactogenic antibody response in mice. Antiviral Res 8(5-6):283-297.

Jarvis P, Robinson C (2004) Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. Curr Biol. 14(24):R1064-1077.

Jarvis P (2008) Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. New Phytol 179(2):257-285.

Jefferson R A, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS-fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6:3901–3907.

Jobling SA, Jarman C, Teh MM, Holmberg N, Blake C, Verhoeyen ME (2003) Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. Nat Biotechnol 21(1):77-80.

Joensuu JJ, Kiklander-Teeri V, Brandle JE (2008) Transgenic plants for animal health: plant-made vaccine antigens for animal infectious disease control. Phytochem Rev 7:553-577.

Ketchner SL, Drapier D, Olive J, Gaudriault S, Girard-Bascou J, Wollman FA (1995) Chloroplasts can accommodate inclusion bodies. Evidence from a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in the assembly of the chloroplast ATP synthase. J Biol Chem 270(25):15299-15306.

Kieselbach T, Hagman, Andersson B, Schröder WP (1998) The thylakoid lumen of chloroplasts. Isolation and characterization. J Biol Chem 273(12):6710-6716.

Koya V, Moayeri M, Leppla SH, Daniell H (2005) Plant based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. Infect Immun 73:8266–8274.

Kuroda H, Maliga P (2001a) Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs. Nucleic Acids Res 29(4):970-975.

Kuroda H, Maliga P (2001b) Sequences downstream of the translation initiation codon are important determinants of translation efficiency in chloroplasts. Plant Physiol 125(1):430-436.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

Lai H, Engle M, Fuchs A, Keller T, Johnson S, Gorlatov S, Diamond MS, Chen Q (2010) Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 107(6):2419-2424.

Lau OS, Sun SS (2009) Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. Biotechnol Adv 27(6):1015-1022.

LaVallie ER, McCoy JM (1995) Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol 6:501-506.

Lee J, Yoo D, Redmond MJ, Attah-Poku SK, van den Hurk JV, Babiuk LA (1998) Characterization of the interaction between VP8 of bovine rotavirus C486 and cellular components on MA-104 cells and erythrocytes. Can J Vet Res 62(1):56-62.

Leelavathi S, Reddy VS (2003) Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. Mol Breed 11:49-58.

Li Y, Sun M, Liu J, Yang Z, Zhang Z, Shen G (2005) High expression of foot-and-mouth disease virus structural protein VP1 in tobacco chloroplasts. Plant Cell Rep 25(4):329-333.

Logan D, Abu-Ghazaleh R, Blakemore W, Curry S, Jackson T, King A, Lea S, Lewis R, Newman J, Parry N (1993). Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. Nature 362(6420):566-568.

Lutz KA, Svab Z, Maliga P (2006). Construction of marker-free transplastomic tobacco using the Cre-loxP site-specific recombination system. Nature Protocols 1(2):1-11.

Magee AM, Coyne S, Murphy D, Horvath EM, Medgyesy P, Kavanagh TA (2004) T7 RNA polymerase-directed expression of an antibody fragment transgene in plastids causes a semi-lethal pale-green seedling phenotype. Transgenic Res 13(4):325-337.

Maliga P (2004) Plastid transformation in higher plants. Annu Rev Plant Biol 55:289-313.

Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y. Systemic (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. Nat Biotechnol 23(6):718-723.

Matsui SM, Offit PA, Vo PT, Mackow ER, Benfield DA, Shaw RD, Padilla-Noriega L, Greenberg HB (1989) Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to the heterotypic neutralization domain of VP7 and the VP8 fragment of VP4. J Clin Microbiol 27(4):780-782.

Mc Cabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle bombardment. Biotechnology, 6:923-926.

Mc Cabe MS, Klaas M, Gonzalez-Rabade N, Poage M, Badillo-Corona JA, Zhou F, Karcher D, Bock R, Gray JC, Dix PJ (2008) Plastid transformation of high-biomass tobacco variety Maryland Mammoth for production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen. Plant Biotechnol J 6:914–929.

Meeusen ENT, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G (2007) Current status of veterinary vaccines. Microbiol Rev 20:1001-1014.

Menkhaus TJ, Bai Y, Zhang C, Nikolov ZL, Glatz CE (2004) Considerations for the recovery ofrecombinant proteins from plants. Biotechnol Prog 20:1001–14.

Miele L. Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations (1997) Trends Biotechnol 15(2):45-50.

Molina A, Hervás-Stubbs S, Daniell H, Mingo-Castel AM, Veramendi J (2004) High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. Plant Biotechnol J 2:141–153.

Mor TS, Gómez-Lim MA, Palmer KE (1998) Perspective: edible vaccines--a concept coming of age. Trends Microbiol 6(11):449-453.

Morgenfeld M, Segretin ME, Wirth S, Lentz E, Zelada A, Mentaberry A, Gissmann L, Bravo-Almonacid F (2009) Potato virus X coat protein fusion to human papillomavirus 16 E7 oncoprotein enhance antigen stability and accumulation in tobacco chloroplast. Mol Biotechnol 43(3):243-249.

Mori H, Cline K (2001) Post-translational protein translocation into thylakoids by the Sec and DeltapH-dependent pathways. Biochim Biophys Acta 1541(1-2):80-90.

Mozgovoj M, Wigdorovitz A, Santos MJ, Parreño V, Gómez C, Pérez-Filgueira DM, Trono KG, Ríos RD, Franzone PM, Fernández F, Carrillo C, Babiuk LA, Escribano JM, Borca MV (2004a) Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants. J Gen Virol. 85(7):1825-1832.

Mozgovoj MV, Pérez-Filgueira DM, Wigdorovitz A, Dus Santos MJ, Parreño V, Trono K, Fernandez FM, Carrillo C, Babiuk LA, Morris TJ, Borca MJ (2004b). Passive protection to bovine rotavirus (BRV) infection induced by a BRV VP8* produced in plants using a TMV-based vector. Arch Virol 149(12):2337-48.

Mozgovoj MV (2008) Expresión de antígenos de rotavirus bovino en plantas. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15(3): 473-497.

Muto M, Henry RE, Mayfield SP (2009) Accumulation and processing of a recombinant protein designed as a cleavable fusion to the endogenous Rubisco LSU protein in *Chlamydomonas* chloroplast. BMC Biotechnol 9:26.

Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, Leonhardt H, Magez S, Nguyen VK, Revets H, Rothbauer U, Stijlemans B, Tillib S, Wernery U, Wyns L, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Saerens D (2009) Camelid immunoglobulins and nanobody technology. Vet Immunol Immunopathol. 128(1-3):178-183.

Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B, Bock R (2009) Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. The Plant J 57:436-445.

Offit PA, Clark HF (1985) Protection against rotavirus-induced gastroenteritis in a murine model by passively acquired gastrointestinal but not circulating antibodies. J Virol 54 (1):58-64.

Olichon A, Surrey T (2007) Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in *Escherichia coli*. J Biol Chem 282(50):36314-20.

Patel J, Zhu H, Menassa R, Gyenis L, Richman A, Brandle J (2007) Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves. Transgenic Res 16(2):239-249.

Perez Aguirreburaldo MS, Gomez C, Pecora A, Ardila F, Dus Santos MJ, Wigdorovitz A (2009) Efficacy of a BVDV subunit vaccine produced in alfalfa transgenic plants (en prensa).

Peternel S, Grdadolnik J, Gaberc-Porekar V, Komel R (2008). Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. Microb Cell Fact 7:34.

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Measurements of chlorophyll, protein, and oxygen evolution. Biochim Biophys Acta 975:384-394.

Prasad BVV, Estes MK (2000) "Electron cryomicroscopy and computer image processing techniques. Use in structure-function studies of rotavirus." En: Methods in molecular medicine. Rotaviruses methods and protocols. Gray J, Desselberger U (eds). Humana Press. New Jersey, USA: 9-31.

Ruf S, Biehler K, Bock R (2000) A small chloroplast-encoded protein as a novel architectural component of the light-harvesting antenna. J Cell Biol 149(2):369-378.

Ruggeri FM, Greenberg HB (1991) Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. J Virol 65(5):2211-2219.

Rybicki EP (2009) Plant-produced vaccines: promise and reality. Drug Disc Today 14:16-24.

Rybicki EP (2010) Plant-made vaccines for humans and animals. Plant Biotechnol J 8(5):620-637.

Sala F, Manuela Rigano M, Barbante A, Basso B, Walmsley AM, Castiglione S. (2003) Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. Vaccine 21(7-8):803-808.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989). Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edition. Ed: Nolan, C. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Segretin ME (2009). Transformación de cloroplastos e inducción del mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional para obtener resistencia a patógenos en solanáceas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Sheludko YV, Sindarovska YR, Gerasymenko IM, Bannikova MA, Kuchuk NV (2007) Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. Biotechnol Bioeng 96:608-614.

Sobrino F, Sáiz M, Jiménez-Clavero MA, Núñez JI, Rosas MF, Baranowski E, Ley V (2001) Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. Vet Res 32:1-30.

Staub JM, Maliga P (1993) Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the psbA mRNA. EMBO J 12(2):601-606.

Staub JM, Maliga P (1994) Translation of psbA mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids. Plant J 6(4):547-553.

Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye G, Russell DA (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. Nat Biotechnol 18(3):333-338.

Streatfield SJ, Howard JA (2003) Plant-based vaccines. Int J Parasitol 33(5-6):479-493.

Streatfield SJ (2007) Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. Plant Biotechnol J 5(1):2-15.

Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastid in higher plants. Proc Natl Acad Sci USA 87:8526-8530.

Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation by selection for a chimeric *aadA* gene. Proc Natl Acad Sci USA 90:913-917.

Tihova M, Dryden KA, Bellamy AR, Greenberg HB, Yeager M (2001) Localization of membrane permeabilization and receptor binding sites on the VP4 hemagglutinin of rotavirus: implications for cell entry. J Mol Biol 314(5):985-992.

Tissot G, Canard H, Nadai M, Martone A, Botterman J, Dubald M (2008) Translocation of aprotinin, a therapeutic protease inhibitor, into the thylakoid lumen of genetically engineered tobacco chloroplasts. Plant Biotechnol J 6(3):309-320.

Tô TL, Ward LA, Yuan L, Saif LJ (1998) Serum and intestinal isotype antibody responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. J Gen Virol 79(11):2661-2672.

Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, Wijk KJ, Dougan G, Maliga P (2003) Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts. Nucleic Acids Res 31:1174-1179.

van der Linden RH, de Geus B, Frenken GJ, Peters H, Verrips CT (2000) Improved production and function of llama heavy chain antibody fragments by molecular evolution. J Biotechnol. 2000 Jul 14;80(3):261-270.

van Rooijen GJ, Moloney MM (1995) Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. Biotechnology 13(1):72-77.

Vasil IK (2008) A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. Plant Cell Rep 27(9):1423-1440.

Vermij P, Waltz E (2006) USDA approves the first plant-based vaccine. Nat Biotechnol 24:233-234.

von Heijne G, Steppuhn J, Herrmann RG (1989) Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. Eur J Biochem. 1;180(3):535-545.

Walmsley AM, Arntzen CJ (2003) Plant cell factories and mucosal vaccines. Curr Opin Biotechnol 14(2):145-150.

Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Serreze DV, Goldbaum FA, Haag F, Koch-Nolte F (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. Med Microbiol Immunol 198(3):157-174.

Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos MJ, Sadir AM, Ríos R, Franzone P (1999) Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunized with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. Virology 255:347–353.

Willits CO, Swaim ML, Connelly JA, Brice BA (1950) Spectrophotometric determination of nicotine. Analytical

Chemistry 430-433.

Wirth S, Calamante G, Mentaberry A, Bussmann L, Lattanzi M, Barañao L, and Fernando Bravo-Almonacid F (2004) Expression of active human epidermal growth factor (hEGF) in tobacco plants by integrative and non-integrative systems. Molecular Breeding 13: 23–35.

Wirth, SA (2005). Desarrollo de sistemas de expresión integrativos y no integrativos para la producción de biofármacos en plantas de tabaco. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Wirth S, Segretin ME, Mentaberry A, Bravo-Almonacid FF (2006). Accumulation of hEGF and hEGF-fusion proteins in chloroplast-transformed tobacco plants is higher in the dark than in the light. J Biotechnol 125:159-172.

Ye GN, Hajdukiewicz PT, Broyles D, Rodriguez D, Xu CW, Nehra N, Staub JM (2001) Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. Plant J 25(3):261-270.

Zamorano P, Wigdorovitz A, Pérez-Filgueira M, Carrillo C, Escribano JM, Sadir AM (1995). A 10 amino acid linear sequence of VP1 of foot and mouth disease virus (FMDV) containing B and T cell epitopes induces protection in mice. Virology 212:614–621.

Zhou F, Badillo-Corona JA, Karcher D, Gonzalez-Rabade N, Piepenburg K, Borchers AM, Maloney AP, Kavanagh TA, Gray JC, Bock R (2008) High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. Plant Biotechnol J 6:897–913.