



Alfano, Edgardo Federico

Diseño de un nuevo vector para la transformación de cloroplastos de tabaco y su aplicación a la producción de antígenos de interés en medicina veterinaria



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Alfano, E. F. (2016). *Diseño de un nuevo vector para la transformación de cloroplastos de tabaco y su aplicación a la producción de antígenos de interés en medicina veterinaria. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2174>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Diseño de un nuevo vector para la transformación de cloroplastos de tabaco y su aplicación a la producción de antígenos de interés en medicina veterinaria

Design of a new vector for tobacco chloroplast transformation and its application to the production of antigens of interest in veterinary medicine

TESIS DOCTORAL

Edgardo Federico Alfano

federicoa13@gmail.com

Resumen

Durante la presente tesis doctoral se generaron plantas transplastómicas de tabaco y se obtuvieron vacunas experimentales a partir de la expresión de antígenos de interés veterinario fusionados a la proteína decamérica y altamente inmunogénica lumazina sintasa de *Brucella* spp. (BLS).

El primer antígeno expresado en este sistema fue la proteína VP8d (fragmento menor de 18,41 kDa derivado de VP8* que posee 27,54 kDa) de Rotavirus Bovino (RVB), cepa C486, fusionada a BLS (BLSVP8d-Bov). VP8* es una proteína no glicosilada de la cápside de rotavirus que además de ser un determinante importante de infectividad viral es un antígeno generador de anticuerpos neutralizantes. BLS forma decámeros y funciona como presentador para aumentar la inmunogenicidad de péptidos fusionados a su extremo N-terminal. Se generaron plantas transplastómicas que fueron exhaustivamente caracterizadas a nivel molecular por *Southern*, *northern* y *western blot*. BLSVP8d-Bov se comportó de manera altamente estable en cloroplastos. Los niveles más altos de acumulación se observaron en las hojas de mayor edad, representando al menos el 40% de la proteína soluble total de la hoja (PST) (4,85 mg/g tejido fresco [TF]). Este nivel de expresión fue 10 veces superior al obtenido en plantas transplastómicas generadas previamente en el laboratorio expresando VP8* de RVB. Independientemente de los altos niveles de expresión no se observaron diferencias fenotípicas respecto a plantas sin transformar. La fusión se mantuvo soluble en todo momento, pese a que VP8* forma cuerpos de inclusión insolubles al ser expresada usando el mismo sistema. BLSVP8d-Bov también se mantuvo soluble y estable en material liofilizado almacenado a temperatura ambiente. Adicionalmente, la inmunogenicidad de BLSVP8d-Bov fue evaluada con éxito en un modelo de gallinas ponedoras. Pudieron detectarse anticuerpos IgY específicos contra la fusión en

la yema de los huevos obtenidos a partir de animales inmunizados con extractos solubles totales provenientes tanto de hojas frescas como liofilizadas.

Dados los resultados alentadores obtenidos con BLSVP8d-Bov se decidió expresar también en el mismo sistema el antígeno VP8d de Rotavirus Equino (RVE), cepa H2, tanto solo como fusionado a BLS. En ambos casos se obtuvieron plantas transplastómicas fenotípicamente indistinguibles de plantas sin transformar, las cuales fueron caracterizadas molecularmente. Las proteínas recombinantes se mantuvieron estables y solubles tanto en hojas frescas como liofilizadas almacenadas a temperatura ambiente. Los niveles de expresión registrados fueron de alrededor de 2% y 4% de PST para VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq, respectivamente (duplicándose en hojas liofilizadas), por lo que la fusión a BLS representa una estrategia potencial para aumentar los niveles de expresión de otras proteínas. Dado que BLSVP8d-Eq es inestable e imposible de producir en *Escherichia coli* las plantas representaron una alternativa más conveniente.

La estrategia de fusión a BLS, evaluada por primera vez en plantas, representó una plataforma interesante para la producción de antígenos inyectables, o incluso orales, con inmunogenicidad potencialmente aumentada. La estabilidad de los antígenos recombinantes incluso en hojas liofilizadas podría traducirse en una reducción de costos y simplificar el procesamiento, purificación y almacenamiento, simplificando los esquemas de inmunización.

Complementariamente, y de acuerdo a cuestiones de bioseguridad y percepción pública vigentes, se evaluó el gen de flavoxodina, que proporciona resistencia frente a estrés oxidativo o salino, como selector de plantas transplastómicas para reemplazar la selección por antibióticos. Entre otras dificultades, los usos de metil viológeno (propagador de superóxidos) o cloruro de sodio demostraron ser incompatibles con los procesos de regeneración empleados de rutina en el laboratorio, por lo cual sería muy difícil y poco conveniente intentar encontrar las condiciones para utilizar flavodoxina como gen selector primario. A la luz de estos y otros resultados, el gen de flavodoxina sería mejor aprovechado como un selector secundario alternativo para remover los genes selectores primarios clásicos que confieren resistencia a antibióticos.

Palabras clave: Plantas transplastómicas, cloroplasto, tabaco, rotavirus bovino, rotavirus equino, lumazina sintasa, VP8, vacuna, liofilización, IgY, flavoxodina, selector, estrés abiótico.

Abstract

During this PhD thesis we obtained transplastomic tobacco plants and experimental vaccines were derived from the expression of antigens of interest in veterinary medicine fused to the multimeric and highly immunogenic *Brucella* spp. lumazine synthase (BLS).

The first antigen we expressed with this system was the VP8d protein (a smaller fragment of 18,41 kDa derived from 27,54 kDa VP8*) from Bovine Rotavirus (BRV), strain C486, fused to BLS (BLSVP8d-Bov). VP8* is a non-glycosylated protein of the rotavirus capsid and is the major determinant of viral infectivity and one of the neutralizing antigens. BLS is a decameric protein which can accommodate foreign polypeptides or protein domains fused to its N-termini, markedly increasing their immunogenicity. Transplastomic plants were obtained and characterized by Southern, northern and western blot. BLSVP8d-Bov was highly stable in chloroplasts. The highest expression levels were observed in older leaves, representing at least 40% of the leaf total soluble protein (TSP) (4.85 mg/g fresh tissue [FT]). This expression level was 10 times higher than the one obtained for transplastomic plants which were generated previously by our group and expressed VP8* from BRV. Despite the high expression levels, wild-type and transplastomic BLSVP8d-Bov plants were phenotypically indistinguishable from each other. The fusion always remained soluble and stable during all stages of plant development although VP8* aggregated as insoluble inclusion bodies when expressed using the same plant system. BLSVP8d-Bov remained soluble and stable even in senescent or lyophilized leaves stored at room temperature. The immunogenicity of BLSVP8d-Bov was evaluated in a laying-hen model. Soluble protein extracts from fresh and lyophilized transplastomic leaves were able to induce specific neutralizing IgY antibodies in egg-yolk.

Given the encouraging results obtained for BLSVP8d-Bov we decided to use the same system to express the VP8d antigen from Equine Rotavirus (ERV), strain H2, alone and fused to BLS. In both cases the transplastomic plants were phenotypically indistinguishable from their non-transformed counterparts. All plants were characterized by Southern, northern and western blot. The recombinant proteins remained stable and soluble both in fresh and lyophilized leaves stored at room temperature. The expression levels obtained were approximately 2% and 4% of TSP for VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq, respectively (doubling in lyophilized leaves), for which fusions to BLS would represent a potential strategy to improve the expression levels of other proteins. It should be noted that since BLSVP8d-Eq was unstable and impossible to express in *Escherichia coli* plants represented a more advantageous strategy.

The BLS scaffold was assessed for the first time in plants. It represented an interesting platform for highly immunogenic injectable, or even oral, subunit vaccines. Lyophilization of transplastomic leaves expressing stable antigenic fusions to BLS would further reduce costs and simplify downstream processing, purification and storage, allowing for more practical vaccines.

Complementarily, and in accordance to the current public perception and biosafety concerns, we evaluated the use of the flavodoxin gene as a selectable marker for the production of transplastomic plants. This gene provides tolerance against oxidative and saline stress,

among many others, which makes it an attractive alternative for the more traditional antibiotic-based selectable markers. Methyl viologen (a superoxide generator) and sodium chloride were not compatible with routine regeneration protocols and it would be difficult to adjust the proper conditions to use the flavodoxin gene for primary selection. Instead, we propose that this gene would be better suited as an alternative for secondary selection to remove the antibiotic-based genes previously used during primary selection.

Keywords: Transplastomic plants, chloroplast, tobacco, bovine rotavirus, equine, lumazine synthase, VP8, vaccine, lyophilization, IgY, flavodoxin, selector, abiotic stress.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES (UNQ)

Departamento de Ciencia y Tecnología

**“DISEÑO DE UN NUEVO VECTOR PARA LA TRANSFORMACIÓN DE CLOROPLASTOS DE TABACO
Y SU APLICACIÓN A LA PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS DE INTERÉS EN MEDICINA
VETERINARIA”**

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad Nacional de Quilmes
en Ciencia y Tecnología.

Lic. Edgardo Federico Alfano

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

Co-director: **Dr. Andrés Wigdorovitz**

Consejero de posgrado: Dr. Claudio Valverde

Lugar de trabajo:

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

Buenos Aires, 2016

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	
Introducción general	2
Sistemas de expresión en plantas y plantas como biorreactores	2
Transformación de cloroplastos por biobalística	7
Vacunas de interés veterinario y molecular farming	10
Hipótesis general	18
Objetivos particulares	18
RESULTADOS	
PARTE I: Expresión en cloroplastos de tabaco del antígeno VP8d de Rotavirus Bovino fusionado a la enzima lumazina sintasa de <i>Brucella Spp.</i>	
Introducción	20
Resultados Parte I	24
Subclonado de la secuencia BLSVP8d-Bov en el vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr	24
Transformación de cloroplastos de tabaco con el vector pBSW-utr/BLSVP8d-Bov	26
Análisis de la integración del transgén y estado homoplástico	29
Análisis de los transcritos.....	30
Expresión de BLSVP8d-Bov en plantas transplastómicas.....	31
Análisis de la solubilidad de BLSVP8d-Bov en extractos de bacterias y plantas	32
Acumulación y estabilidad de BLSVP8d-Bov a lo largo del desarrollo de las plantas transplastómicas	34
Determinación del nivel de expresión de BLSVP8d-Bov soluble en hojas frescas de plantas transplastómicas	35
Análisis de la estabilidad y solubilidad de BLSVP8d-Bov en hojas transplastómicas secas	37
Determinación del nivel de expresión de BLSVP8d-Bov insoluble en hojas secadas artificialmente	39
Determinación del nivel de expresión de la fracción soluble de BLSVP8d-Bov en hojas liofilizadas de plantas transplastómicas.....	42
Inmunogenicidad de BLSVP8d-Bov obtenida a partir de plantas transplastómicas	43
Ensayo de neutralización viral <i>in vitro</i>	45
PARTE II: Expresión en cloroplastos de tabaco de los antígenos VP8d de Rotavirus Equino solo y fusionado a la enzima lumazina sintasa de <i>Brucella Spp.</i>	
Introducción	46
Resultados Parte II	49

Subclonado de la secuencias VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en el vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr	49
Transformación de cloroplastos de tabaco con los vectores pBSW-utr/VP8d-Eq y pBSW-utr-BLSVP8d-Eq	52
Análisis de la integración del transgén y estado homoplástico	54
Análisis de los transcritos.....	55
Expresión de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en plantas transplastómicas	57
Análisis de la solubilidad de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en extractos de hojas de plantas.....	58
Acumulación y estabilidad de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq a lo largo del desarrollo de las plantas transplastómicas	62
Determinación de los niveles de expresión de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en hojas de plantas transplastómicas	64
Inmunogenicidad de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq obtenidas a partir de plantas transplastómicas ..	68
PARTE III Utilización y evaluación del gen de flavodoxina de <i>Anabaena sp.</i> como nuevo selector para la transformación de plástidos.	
Introducción.....	69
Resultados Parte III.....	74
Transformación de cloroplastos de tabaco con el vector pBSW-utr/FLD.....	74
Curvas de regeneración de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Petit Havana en presencia de Cloruro de Sodio.....	83
DISCUSIÓN	
Discusión	92
MATERIALES Y MÉTODOS	
Materiales y métodos.....	104
Cepas bacterianas.	104
Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	104
Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> por electroporación.....	104
Líneas de plantas.....	104
Aislamientos virales.....	105
Plásmidos.	105
Secuencias.....	105
BLSVP8d-Bov, VP8d-Eq, BLSVP8d-Eq, FLD	
Oligonucleótidos iniciadores:.....	108
Cloro fw, Cloro rv, NdeI5´BLSVP8d-Bov, XbaI3´BLSVP8d-Bov, Bsp1286I5´BLS	
Metodología del ADN recombinante.....	108

Preparación de ADN plasmídico.....	108
Reacciones de ligación, cortes con enzimas de restricción y preparación de vectores e insertos.	109
Desfosforilación de extremos compatibles.....	109
Transformación genética de cloroplastos de plantas de tabaco.	109
Preparación y recubrimiento de partículas de oro con ADN plasmídico.....	109
Bombardeo de hojas.	109
Selección de transformantes, cultivo <i>in vitro</i> y rusticación.	110
Esterilización y germinación de semillas de tabaco <i>in vitro</i>	110
Análisis de ADN y ARN.	111
Identificación de plantas transplastómicas mediante PCR.	111
Ensayo de <i>Southern blot</i>	111
Ensayo de <i>northern blot</i>	112
Análisis de proteínas.	113
Análisis de la solubilidad de BLSVP8d-Bov en <i>E. coli</i>	113
Análisis de la solubilidad de BLSVP8d-Bov, BLSVP8d-Eq y VP8d-Eq en plantas transplastómicas	113
Ensayo de SDS-PAGE y <i>western blot</i>	114
Cuantificación de la acumulación de BLSVP8d-Bov, BLSVP8d-Eq y VP8d-Eq en hojas de plantas transplastómicas por SDS-PAGE.....	115
Secado artificial de las hojas de plantas transplastómicas BLSVP8d-Bov.	115
Liofilizado de hojas de plantas WT y transplastómicas BLSVP8d-Bov, BLSVP8d-Eq y VP8d-Eq	115
Inmunización de gallinas con extractos recombinantes conteniendo BLSVP8d-Bov, BLSVP8d-Eq y VP8d-Eq	116
Medición por ELISA de anticuerpos IgY contra BLSVP8d-Bov, BLSVP8d-Eq y VP8d-Eq en yema de huevo.....	116
Ensayo de neutralización viral.....	117
Curvas de regeneración de explantos de <i>N. tabacum</i> que expresan el gen flavodoxina de <i>Anabaena</i> sp. en presencia de NaCl o Metil Viológeno	117
BIBLIOGRAFÍA	
Bibliografía	120

INTRODUCCIÓN

Introducción general

Sistemas de expresión en plantas y plantas como biorreactores

La transformación de especies vegetales es empleada en investigación básica y en numerosas aplicaciones biotecnológicas. Su aprovechamiento comprende múltiples objetivos, incluyendo la expresión de proteínas de interés industrial y/o farmacológico, la resistencia a patógenos y el mejoramiento de características de interés agronómico (Daniell et al., 2002).

Las plantas representan un sistema alternativo de expresión de proteínas heterólogas con diversas ventajas que lo diferencian de los sistemas más clásicos y ya establecidos basados en cultivo de células eucariotas (mamíferos, insectos o levaduras) o bacterianos (Giddings, 2001; Mett et al., 2008). Se denomina “*molecular farming*” a la práctica de aprovechamiento de las plantas como biorreactores para la producción de moléculas y productos recombinantes de alto valor agregado (Ma et al., 2003). Esta práctica, que fue posibilitada por la metodología del ADN recombinante y la transferencia de genes en plantas, surgió a finales de la década del 80 siendo su primer exponente la producción de un anticuerpo monoclonal en plantas de tabaco (Hiatt et al., 1989). Este primer trabajo permitió poner en evidencia el potencial del sistema de producción y desde ese entonces el sistema se fue optimizando y se ha logrado producir exitosamente en diversas especies de plantas un sinnúmero de moléculas que abarcan desde proteínas de interés industrial o farmacéutico, a proteínas utilizadas en diagnóstico médico, antígenos vacunales, vitaminas, carbohidratos, biopolímeros y otros productos secundarios (Jin and Daniell, 2015; Paul et al., 2013). Las especies empleadas más frecuentemente son tabaco (*Nicotiana tabacum* y *Nicotiana benthamiana*) y lechuga (*Lactuca sativa*), y en menor medida alfalfa, espinaca, soja, papa, arroz, maíz, tomate, frutilla, zanahoria y *Arabidopsis thaliana* entre otras (Rybicki, 2009).

Los primeros productos recombinantes producidos en plantas en llegar al mercado fueron enzimas recombinantes. Tal fue el caso de tripsina, avidina, lacasa y β -glucuronidasa (Sigma-Aldrich, producidas en maíz) y aprotinina (Prodigene y Sigma-Aldrich, producidas en maíz y tabaco)(Hood et al., 1997; Hood et al., 2003; Witcher et al., 1998; Woodard et al., 2003; Zhong et al., 1999). Su destino es el uso en la industria de investigación y/o diagnóstico. Entre otros productos se encuentran la hormona de crecimiento humana y citoquinas, ambos aprobados no solo para diagnóstico sino también para uso en la industria cosmética (ORF Genetics produce estas moléculas en semillas de cebada, <http://orfgenerics.com/ISOkine/ProductList/>).

El primer anticuerpo monoclonal derivado de plantas en llegar al mercado fue el producido en Cuba por la empresa Heber Biotec. Este anticuerpo, producido en tabaco, está dirigido contra el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y es utilizado de rutina para la purificación por inmunoafinidad del HBsAg recombinante para la producción de vacunas contra hepatitis B (Pujol et al., 2005). Además, los organismos regulatorios europeos aprobaron en el año 2003 un anticuerpo monoclonal secretor (CaroRx) producido en tabaco contra *Streptococcus mutans* para ser usado en medicina odontológica para prevenir la colonización microbiana por esta bacteria y la formación de caries en humanos (Ma et al., 1998; Spök et al., 2008).

En cuanto a las vacunas producidas en plantas, la primera en obtener aprobación por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, en el año 2006, fue diseñada contra el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) que afecta a los pollos y fue producida en cultivo de células de tabaco por la empresa Dow AgroScience (Vermij and Waltz, 2006). Hasta el momento sigue siendo la única vacuna recombinante producida en plantas en tener aprobación, aunque la misma no es comercializada (Meeusen et al., 2007).

Más recientemente, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos aprobó en el año 2012 la primera proteína terapéutica recombinante producida en plantas y para su uso en humanos: la glucocerebrosidasa para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. La enzima se comercializa bajo el nombre de ELELYSO y es producida por la empresa Protalix en cultivo de células de zanahoria (Fox, 2012; Shaaltiel et al., 2007). Por otro lado, en el año 2014, frente a una epidemia de ébola en el oeste de África, se aprobó el uso de emergencia de un cóctel de 3 anticuerpos monoclonales (ZMapp) producidos en plantas de tabaco por la empresa Mapp Biopharmaceutical. Pese a no contar con autorización comercial y con solo algunos estudios iniciales en animales el cóctel terapéutico fue administrado en unos pocos individuos infectados, la mayoría de los cuales pudieron recuperarse de la mortal enfermedad (Fox, 2012; Lyon et al., 2014)(<http://edition.cnn.com/2014/08/21/health/ebola-patient-release/index.html>). Asimismo, la empresa canadiense Medicago ha sido autorizada para el uso en casos de emergencia de una vacuna recombinante producida en tabaco contra el virus de la Influenza humana ante la aparición de una pandemia de gripe (D'Aoust et al., 2010; Landry et al., 2014)(<http://www.medicago.com/English/Products/product-pipeline/default.aspx>). Es particularmente a partir de estos últimos casos que se ha puesto en evidencia al público general el potencial de las plantas como biorreactores.

Entre las ventajas más importantes que presentan los sistemas de expresión basados en plantas se destacan el bajo costo y la facilidad de escalado para generar una gran cantidad de biomasa. Esta metodología evita el uso de medios de cultivos costosos y solo se requiere de energía lumínica, agua y sustrato para sustentar el crecimiento. Además, la producción a gran escala no requiere infraestructura especializada sino que se utiliza la misma maquinaria utilizada en el cultivo, cosecha, procesado y almacenamiento de plantas no transgénicas (Daniell et al., 2009; Twyman et al., 2003). Adicionalmente, el uso de un sistema vegetal implica que no existen riesgos de contaminación con patógenos animales o humanos, toxinas microbianas o secuencias oncogénicas, tal como suele ocurrir en otros sistemas (Streatfield and Howard, 2003). Otra de las ventajas del sistema de producción en plantas es que los mecanismos de síntesis y secreción de proteínas y las modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación y la formación de puentes disulfuro, son los propios de las células eucariotas (Gomord and Faye, 2004). Por último, las plantas permiten el almacenamiento estable de las proteínas recombinantes durante largos periodos de tiempo a temperatura ambiente en tejidos de almacenamiento como semillas o tubérculos, facilitando su conservación, transporte y distribución, contribuyendo a abaratar costos (Lau and Sun, 2009; Sala et al., 2003; Streatfield and Howard, 2003). De manera similar, la liofilización de las hojas permite que las proteínas recombinantes se mantengan estables, preserven un plegamiento adecuado y presenten una correcta formación de puentes disulfuro, incluso luego de almacenamiento por largos periodos a temperatura ambiente. Se elimina de este modo la necesidad de mantener la cadena de frío y se simplifica el almacenamiento, transporte y, en el caso de los antígenos, la inmunización posterior (Su et al., 2015). La liofilización presenta beneficios adicionales ya que también permite concentrar los productos recombinantes, facilitando su purificación, y elimina la contaminación microbiana presente en la superficie de las hojas frescas, haciendo más segura a la administración por vía oral de material liofilizado en polvo (Kwon et al., 2013a). En esta vía, la pared celular protege a los antígenos recombinantes de la degradación en por las enzimas y el entorno ácido del estómago y resulta degradada por las bacterias del intestino, permitiendo que el producto recombinante alcance el torrente sanguíneo o el tejido linfático asociado a las mucosas. La administración oral de material vegetal resulta de particular utilidad para conferir inmunidad frente a microorganismos que colonizan las mucosas (Chan and Daniell, 2015).

Existen dos metodologías clásicas empleadas para transformar el genoma nuclear de manera estable para introducir genes foráneos en plantas, los cuales serán transmitidos de una generación a otra. Una estrategia está basada en el uso de *Agrobacterium tumefaciens*

mientras que la segunda se basa en la biobalística. Como resultado de ambas metodologías los transgenes son incorporados al genoma nuclear de manera azarosa en una o más copias. En consecuencia, la expresión de los transgenes suele estar con frecuencia afectada por silenciamiento transcripcional y/o post-transcripcional (Fagard and Vaucheret, 2000). Es por este motivo que al generar una planta transgénica por alguna de estas metodologías se debe hacer un análisis exhaustivo de los niveles de expresión de un gran número de eventos de transformación para encontrar el evento que presenta los niveles de expresión más convenientes. No obstante, los niveles de expresión de proteína recombinante que típicamente se obtienen al transformar plantas a nivel nuclear suelen ser bajos, representando generalmente entre el 0,01 y 0,5% de la proteína soluble total (Daniell et al., 2001b; Floss et al., 2007; Molina et al., 2004).

La transformación transitoria surgió como una alternativa para verificar rápidamente la expresión de genes y la estabilidad de sus proteínas en plantas. Para ello se emplearon en un principio vectores o amplicones virales los cuales eran introducidos por la técnica de agroinfiltración empleando *A. tumefaciens*. Con el correr de los años fueron apareciendo nuevos vectores que incorporan supresores de silenciamiento y cuyos elementos regulatorios están optimizados para alcanzar niveles muy altos de expresión en plazos muy cortos (5-6 días) (Peyret and Lomonosoff, 2015). Estos sistemas son, como comentamos antes, muy útiles para dar respuesta en muy corto plazo a demandas sanitarias, como por ejemplo distintos tipos de pandemias (Streatfield et al., 2015). Esta es una de las técnicas empleadas rutinariamente en la actualidad por la industria dedicada al *molecular farming*. La principal desventaja de esta metodología radica en que los transgenes introducidos no son heredables por lo que se deben transformar las plantas *de novo* cada vez que se necesite el producto recombinante.

La transformación del genoma de cloroplastos es una estrategia alternativa de transformación estable que combina las mejores características de las técnicas anteriormente mencionadas para la expresión de proteínas heterólogas. El cloroplasto es una organela de origen endosimbiótico dentro de la cual tiene lugar el proceso de fotosíntesis y que posee un genoma pequeño y circular de ADN de entre 120-220 kb que codifica alrededor de 130 genes (**Figura 1**) (Rogalski et al., 2015). Dada la naturaleza poliploide del cloroplasto, una sola célula vegetal es capaz de albergar alrededor de 10.000 moléculas de genoma (una célula de mesófilo contiene alrededor de 100 cloroplastos, los cuales a su vez contienen hasta unas 100 copias de genoma cada uno) (Elizabeth, 2005). En la mayoría de las especies el genoma plastídico contiene dos regiones invertidas repetidas (IRA e IRB), las cuales separan una región

larga (LSC) y una región corta (SSC), ambas de copia única (**Figura 1**). A su vez, a grandes rasgos, los genes del genoma plastídico pueden clasificarse en dos grupos: aquellos involucrados en la fotosíntesis y los que participan en los procesos de replicación, transcripción y traducción. Sin embargo, la mayoría de las proteínas presentes dentro del cloroplasto son codificadas a nivel nuclear (Bock, 2015).

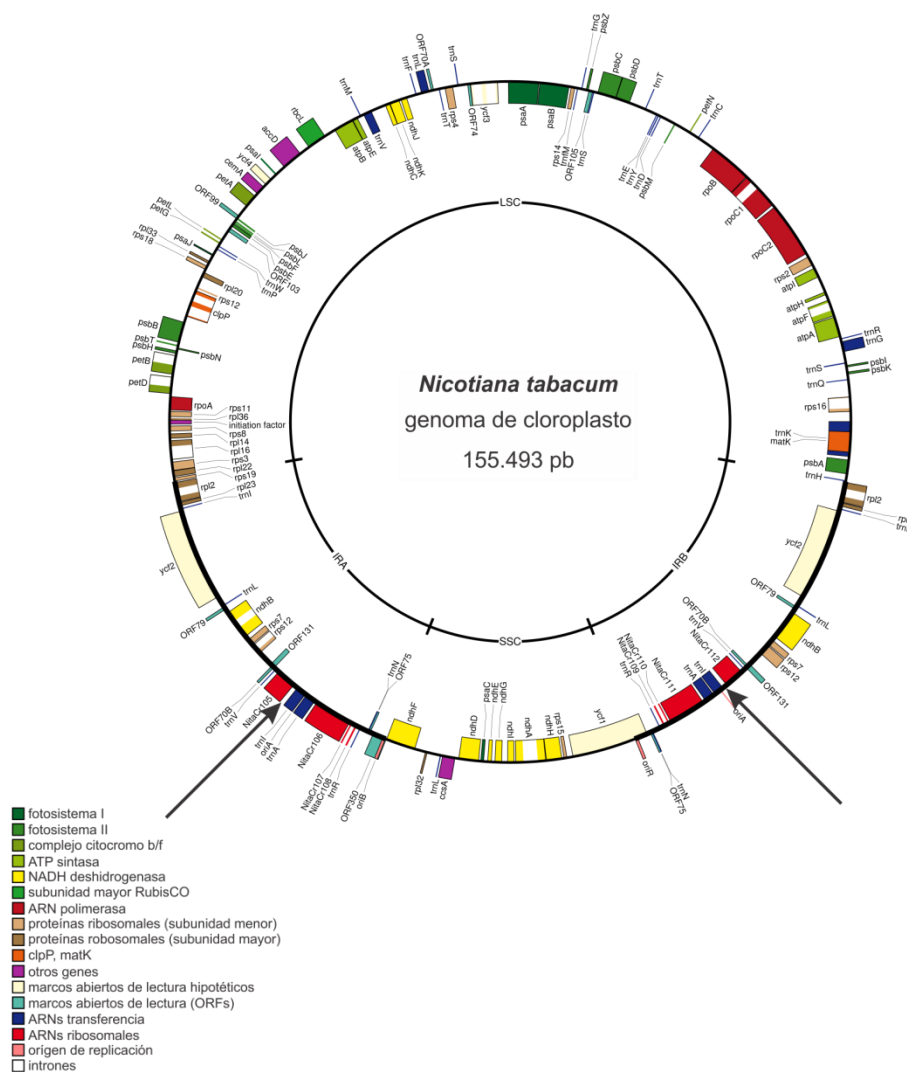


Figura 1. Representación de la organización del genoma de cloroplasto de *N. tabacum*. Se encuentran indicados los principales genes, las regiones invertidas repetidas (IRA e IRB) y las regiones larga (LSC) y corta (SSC) de copia única. Se indican con flechas los sitios de integración, ubicados en las regiones repetidas, empleados durante la presente tesis para transformar el genoma de cloroplasto. Esquemático a partir de (Lohse et al., 2013).

Las plantas transgénicas transformadas a nivel del genoma plastídico se denominan transplastómicas y presentan varias ventajas por sobre la transformación nuclear. En primer lugar, los niveles de expresión suelen ser varios ordenes de magnitud superiores a los

obtenidos en plantas transgénicas nucleares. Utilizando esta técnica se han caracterizado plantas que expresan niveles de proteína recombinante de hasta alrededor del 70% de la proteína soluble total (PST) (Oey et al., 2009; Ruhlman et al., 2010). Esto se debe a la poliploidía del genoma plastídico y la ausencia de efectos de posición y silenciamiento, dado que la inserción en el genoma no ocurre al azar sino por recombinación homóloga en un sitio predeterminado (Bock, 2007). El hecho de que la integración sea dirigida implica que todas las plantas transplastómicas generadas son clones y no hace falta hacer un análisis de una gran cantidad de líneas como ocurre en la transformación nuclear (Svab and Maliga, 1993). Además, dado que los cloroplastos son heredados por vía materna en la mayoría de las especies, las plantas transplastómicas presentan una ventaja desde el punto de vista de la bioseguridad ya que no hay riesgo de transferencia horizontal del transgén por dispersión del polen (Daniell, 2007; Daniell et al., 1998). Otra de las ventajas de la expresión plastídica es que dada la naturaleza procariota de la organela se pueden expresar varios genes en simultáneo a partir de operones, lo cual no es posible a nivel nuclear (De Cosa et al., 2001; Kumar et al., 2012). Por otro lado, si bien las proteínas pueden plegarse correctamente en el ambiente del estroma del cloroplasto, pudiendo formar incluso puentes disulfuro, es importante destacar la ausencia de glicosilación dentro de la organela (Bally et al., 2008). Según el caso, este tipo de modificación post-traducciona puede jugar un rol crucial en la estabilidad o actividad biológica de la proteína recombinante. Si la glicosilación no fuera un requisito indispensable, la expresión plastídica sería beneficiosa ya que se evitaría el agregado de residuos glicosídicos típicos de plantas que pueden resultar inmunogénicos cuando los productos recombinantes son administrados a otros organismos (Gomord et al., 2010).

Transformación de cloroplastos por biobalística

La biobalística (**Figura 2A**) es el método más empleado para transformar el genoma de cloroplasto (Lutz et al., 2006). La técnica consiste en el recubrimiento de micropartículas de oro (o alternativamente tungsteno) con el vector que contiene uno o varios transgenes, entre los cuales se incluye uno que confiera resistencia a un agente selector. La entrada del material genético en las células vegetales se produce a partir de la aceleración, mediante el uso de un cañón génico y gas helio a alta presión, de las partículas en una cámara de vacío y su posterior impacto en el tejido vegetal a transformar (explanto). Una vez ocurrido el daño el ADN del vector logra ingresar a la organela donde finalmente ocurre la recombinación homóloga entre el plastoma y las secuencias flanqueantes que se encuentran a ambos lados de los transgenes

del vector (**Figura 2B**). Como resultado del proceso solo unas pocas copias del genoma de cloroplasto resultan transformadas, las cuales deben ser posteriormente seleccionadas mediante el uso del agente selector correspondiente. Para ello se colocan los explantos divididos en fragmentos más pequeños en un medio que contiene el selector más hormonas que permiten la regeneración de brotes resistentes únicamente a partir de las células transformadas. La presencia continua del selector en el medio favorece el enriquecimiento de las copias transformadas del plastoma a medida que ocurre la multiplicación celular. Es frecuente que en esta primera instancia las plantas obtenidas aún presenten una mezcla de plastomas transformados y no transformados (son heteroplásticas), por lo cual deben ser sometidas a nuevas rondas de regeneración adicionales en presencia del agente selector para garantizar la homogeneidad de plastomas transformados (estado homoplastídico) (Bock, 2001). Las plantas obtenidas desarrollan raíces en un medio sin hormonas y finalmente se crecen en sustrato en invernadero dando lugar a semillas que heredan los transgenes y por tanto deben ser capaces de germinar en presencia del selector (**Figura 3**).

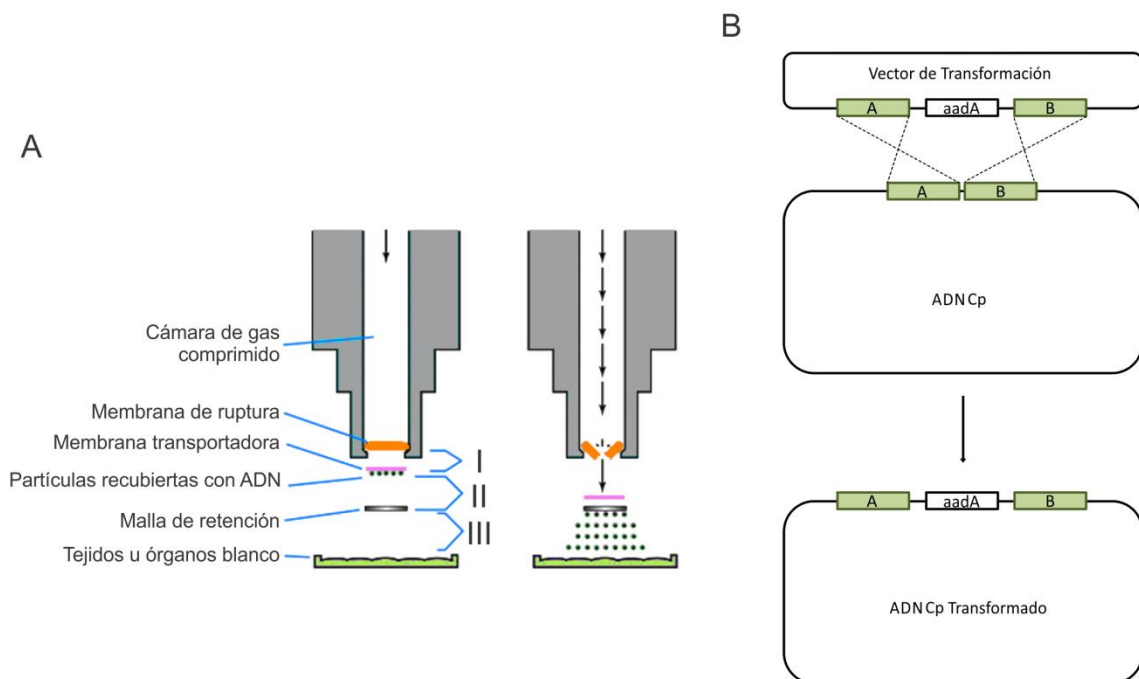


Figura 2. Transformación del genoma plastídico mediante biobalística y recombinación homóloga. (A) Se esquematiza el cañón génico empleado en biobalística. A una presión determinada la membrana de ruptura se rompe y permite la aceleración de la membrana transportadora con las micropartículas recubiertas con el ADN. La membrana es retenida por una malla que permite el paso de las partículas para que estén impacten en el tejido a transformar. La presión y las distancias I, II y III pueden ser variadas en función del tejido a transformar. (B) Una vez dentro de las células vegetales el ADN del vector se integra en unas pocas copias del genoma de cloroplasto (ADNCp) mediante recombinación de las secuencias flanqueantes homólogas del vector con el plastoma. De esta manera se incorpora al genoma el gen *aadA* que confiere resistencia al antibiótico espectinomomicina y que permite la selección posterior de los plastomas transformados. Adaptado de (Bock and Khan, 2004).

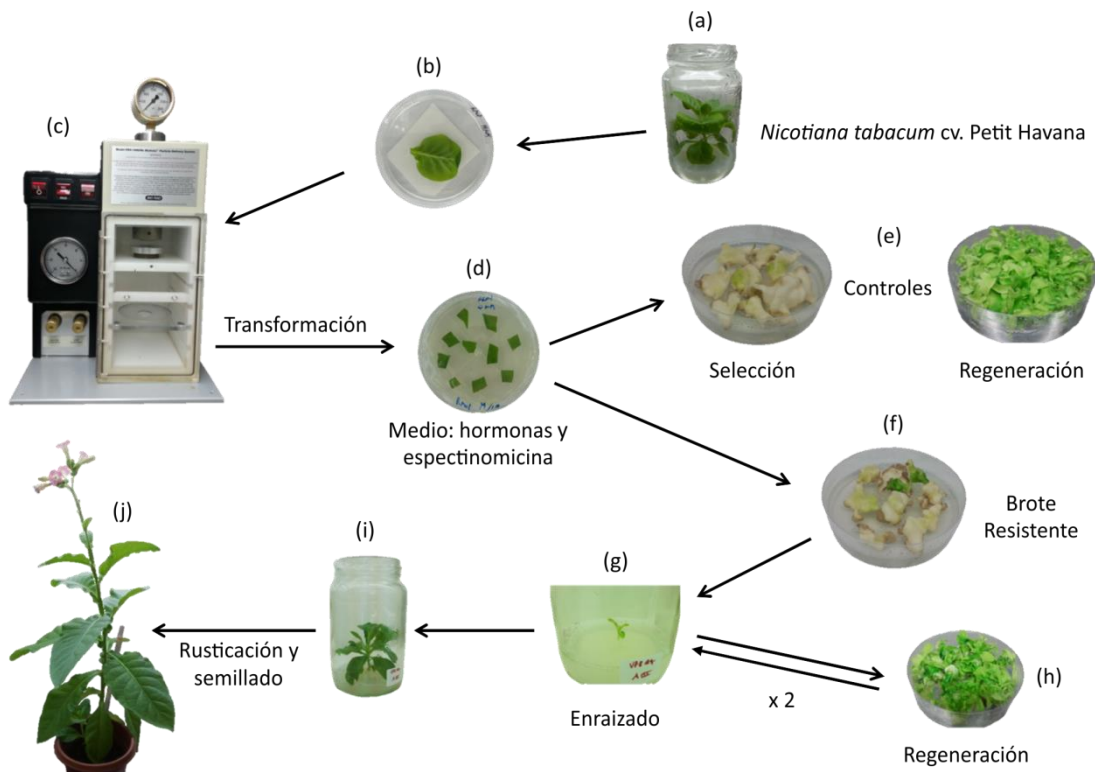


Figura 3. Procedimiento empleado para la obtención de plantas transplastómicas. Semillas de *N. tabacum* cv. Petit Havana son esterilizadas y germinadas *in vitro* (a). Las hojas de plantas de unas 3 semanas de edad, colocadas en un medio con hormonas para permitir la regeneración, conforman el material vegetal (explanto) que se emplea para la transformación (b) mediante biobalística usando un cañón génico PDS-1000/He fabricado por BioRad (c). Luego de 48 hs post-transformación los explantos son cortados en fragmentos más pequeños y son colocados en medio de regeneración en presencia del antibiótico espectinomicina para seleccionar las células vegetales transformadas (d). En paralelo se realizan controles de selección (en medio de regeneración con y sin antibiótico, respectivamente) con hojas *wild-type* sin transformar (e). Luego de aproximadamente 4 semanas regeneran los primeros brotes resistentes al antibiótico (f), los cuales son cortados colocados en medio con antibiótico y sin hormonas donde regeneran raíces espontáneamente (g). Fragmentos de hoja de estas plantas son sometidos a dos rondas adicionales de regeneración para asegurar la homoplasia (h). Finalmente los brotes obtenidos son enraizados y dan lugar a una planta (i) que es removida del medio de cultivo y transferida a sustrato en un invernadero para desarrollarse y dar lugar a semillas que portan los transgenes (j).

En la actualidad existen diversos vectores empleados en la transformación de cloroplastos, los cuales difieren en la identidad de los diferentes elementos que lo componen (desde las regiones flanqueantes que permiten la recombinación hasta los promotores, terminadores y secuencias no traducibles, entre otros) (Jin and Daniell, 2015). En nuestro laboratorio se desarrolló previamente el vector pBSW5'UTR el cual dirige la integración a una

región intergénica transcripcionalmente activa entre los genes *rrn16S* y *trnI* (en el operón *rrn*), la cual a su vez está ubicada dentro de las repeticiones invertidas del plastoma. El vector permite la expresión del gen *aadA*, el cual confiere resistencia al antibiótico espectinomicina, y el gen de interés a partir de un operón. Un promotor *Prrn* y un sitio de unión a ribosoma controlan la expresión de ambos genes mientras que el promotor fuerte inducible por luz y la región 5' no traducible (5'UTR, que incluye un sitio de unión a ribosoma) del gen *psbA* permiten la sobre-expresión del gen de interés. Como terminador de la transcripción se incluye el correspondiente al gen *RPS16* (Segretin, 2009; Wirth, 2005).

El vector pBSW5'UTR ha sido empleado exitosamente en el laboratorio para la obtención de plantas transplastómicas de *Nicotiana tabacum* y *Solanum tuberosum* que expresan distintos tipos de moléculas, las cuales abarcan desde la enzima β -glucuronidasa (Segretin et al., 2011) y proteínas antimicrobianas (osmotina AP24, β -1,3-glucanasa, dermaseptina s1 y defensinas) para conferir resistencia a patógenos, hasta proteínas de interés farmacéutico (factor de crecimiento epidérmico humano, hEGF, (Wirth et al., 2006)) y antígenos vacunales humanos (E7 del virus del papiloma humano, (Morgenfeld et al., 2009)) para *molecular farming*. Se han expresado variantes de algunas de estas proteínas fusionadas por su extremo N-terminal a otras proteínas de manera de conferirles estabilidad y/o inmunogenicidad incrementada. Asimismo, se desarrollaron otras variantes que permiten el redireccionamiento mediante péptidos de tránsito desde el estroma hacia el lumen del cloroplasto entorno en el cual, en algunos casos, pudieron obtenerse mejores niveles de expresión (Lentz et al., 2012; Morgenfeld et al., 2014). El grupo cuenta además con experiencia en el desarrollo de plantas transgénicas nucleares para la producción de moléculas de interés terapéutico (Wirth et al., 2004; Wirth, 2005).

Vacunas de interés veterinario y molecular farming

La vacunación con fines veterinarios constituye una estrategia efectiva para la prevención y control del desarrollo de enfermedades virales infecciosas, las cuales tienen un impacto negativo en la salud y bienestar animal y son responsables de pérdidas importantes de rendimiento. El objetivo principal de la vacunación es, precisamente, mejorar la salud, la calidad de vida y la producción animal de manera costo-efectiva. Ciertos tipos de infecciones pueden incluso predisponer a los animales para infectarse posteriormente con patógenos de otro tipo (Martella et al., 2010; Ruiz et al., 2015; Shams, 2005). La mejoría obtenida en la salud mediante vacunación no solo repercute en los animales, sino que también puede tener un

efecto sobre la salud humana ya que muchas enfermedades que afectan animales son de tipo zoonótico (Woolhouse and Gowtage-Sequeria, 2005).

Los sistemas empleados para la producción de vacunas recombinantes deben ser idealmente rápidos y de bajo costo, permitiendo un fácil almacenamiento, distribución, purificación y administración de proteínas recombinantes funcionales para vacunación (Floss et al., 2007; Ruiz et al., 2015).

Las estrategias actuales de vacunación animal hacen uso de sistemas basados en bacteria, células de levadura o de mamífero para la producción de cepas patogénicas intactas atenuadas o inactivadas. Si bien las cepas atenuadas perdieron la virulencia, estas todavía son replicativas y se corre el riesgo de que su material genético recombine dando nuevamente lugar a una cepa virulenta infectiva (Muskett et al., 1985). En nuestro país no están permitido este tipo de vacunas para bovinos ni equinos, sin embargo si están permitidas en avicultura. Además, cabe mencionar que la administración de partículas virales atenuadas completas interfiere con los análisis serológicos posteriores para control de las enfermedades (Ruiz et al., 2015). Es por eso que las vacunas a subunidad constituyen una alternativa más segura ya que solamente están compuestas por antígenos aislados y en ningún momento está presente la potencial infección por el uso de un virus completo. Para este tipo de vacunas el uso de sistemas de producción clásicos en células eucariotas conlleva el riesgo asociado de contaminación con patógenos o toxinas que potencialmente pueden afectar a los animales (EMA, 2015; Fischer et al., 2013).

Desde hace alrededor de dos décadas, las plantas se han venido posicionando como sistemas alternativos de producción de vacunas a subunidad con fines veterinarios (Obembe et al., 2011; Rybicki, 2014). Tal y como se mencionó anteriormente, el uso de plantas para *molecular farming* constituye una alternativa de bajo costo, fácilmente escalable, desprovista de contaminantes animales, que permite modificaciones post-traduccionales y que presenta almacenamiento y distribución simplificada de los antígenos vacunales.

En la actualidad existe una gran cantidad de trabajos dedicados a la producción de antígenos vacunales de interés veterinario mediante *molecular farming* en especies vegetales de lo más diversas transformadas por diferentes metodologías. Se han podido expresar exitosamente en buenos niveles distintos antígenos virales, bacterianos y de parásitos eucariotas cuya inmunogenicidad ha sido oportunamente demostrada en los modelos animales de interés usando diferentes vías de inmunización (por inyección o vía oral, para

producir respuestas de tipo humoral o a nivel de mucosas, respectivamente) (Floss et al., 2007; Liew and Hair-Bejo, 2015; Ruiz et al., 2015; Rybicki, 2010; Scotti and Rybicki, 2013).

La vacuna hecha en plantas contra el virus de la enfermedad Newcastle (NDV) de pollos fue la primera en obtener aprobación regulatoria del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos Virus en el año 2006. El antígeno viral recombinante NH producido mediante transformación con *Agrobacterium* fue capaz de proteger a los pollos frente a la infección con NDV (Cardinau et al., 2004; Vermij and Waltz, 2006). Si bien Dow AgroSciences cuenta con la aprobación necesaria, esta vacuna no se comercializa en la actualidad. El producto sirvió más bien como prueba de concepto de la factibilidad regulatoria para aprobar un producto recombinante hecho en plantas (Meeusen et al., 2007).

La facilidad de evaluación de los antígenos en sistemas animales específicos y la demostración de una regulatoria más laxa en el caso de antígenos de interés veterinario, comparada con aquellos producidos para uso en humanos, han contribuido enormemente a la intensificación del *molecular farming* (Liew and Hair-Bejo, 2015; Rybicki, 2010; Santi, 2009).

En la **tabla 1** se muestran solo algunos de los antígenos virales de interés veterinario más relevantes producidos en plantas. Como puede apreciarse, los antígenos expresados, las especies y metodología de transformación empleadas y los modelos de evaluación animal son de lo más variados (Liew and Hair-Bejo, 2015; Rybicki, 2010).

Animal	Virus	Antígeno	Especie vegetal	Sistema de expresión	Modelo Animal	Referencia
Bovino	Rotavirus	VP2, VP6, VP7	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Plantas transgénicas	Ratón (O)	(Yang et al., 2011)
		VP2, VP6	<i>Solanum lycopersicum</i>	Plantas transgénicas	Ratón (IP)	(Saldana et al., 2006)
		VP6	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Expresión transitoria	Ratón (O)	(Zhou et al., 2010)
			<i>Medicago sativa</i>	Plantas transgénicas	Ratón (IG)	(Dong et al., 2005)
	Virus de la fiebre aftosa (FMDV) (Ganado Bovino, Ovino, Porcino, Caprino)	VP1	<i>Chenopodium quinoa</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i>	Infección con Virus del mosaico del bambú	Cerdo (IM)	(Yang et al., 2007)
			<i>Chenopodium amaranticolor</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i>	Infección con Virus A de la necrosis del tabaco	Ratón (IM)	(Zhang et al., 2010)
			<i>Stylosanthes guianensis</i>	Plantas transgénicas	Ratón (O)	(Wang et al., 2008)
			<i>Crotalaria juncea</i>	Plantas transgénicas	Cobayo (O, P)	(Rao et al., 2012)
			<i>Nicotiana tabacum</i>	Plantas transplastómicas	ne	(Li et al., 2006)
		<i>Nicotiana tabacum</i>	Plantas transplastómicas	Ratón (IP)	(Lentz et al., 2009)	
		P1	<i>Nipponbare</i> (Arroz Japonica)	Plantas transgénicas	Ratón (IP, O)	(Wang et al., 2012)
		P1-2A3C	<i>Solanum lycopersicum</i>	Plantas transgénicas	Cobayo (IM)	(Pan et al., 2008)
	VP1, VP4, 2C, 3D	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Expresión transitoria	Cobayo (IM)	(Andrianova et al., 2011)	
	Papilomavirus (BPV)	L1	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Expresión transitoria	Conejo	(Love et al., 2012)
Virus de la lengua azul (BTV)	VP2, VP3, VP5, VP7	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Expresión transitoria	Oveja (SC)	(Thueneman et al., 2013)	
Virus de la diarrea viral bovina (BVDV)	E2	<i>Nicotiana tabacum</i>	Expresión transitoria	Cobayo (SC)	(Nelson et al., 2012)	
		<i>Medicago sativa</i>	Plantas transgénicas	Cobayo (IM), Bovino (IM)	(Perez Aguirreburua et al., 2013)	
Pollo	Virus de la enfermedad Newcastle (NDV)	Proteína de fusión	<i>Zea mays</i>	Plantas transgénicas	Pollo (O)	(Guerrero-Andrade et al., 2006)
	Virus de la bronquitis infecciosa (IBV)	Glicoproteína S1	<i>Solanum tuberosum</i> (tubérculo)	Plantas transgénicas	Ratón (IG), Pollo (O, IM)	(Zhou et al., 2003)
	Virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV)	VP2	<i>Oryza sativa</i> (Japonica) (Semillas)	Plantas transgénicas	Pollo (O)	(Wu et al., 2007)
<i>Chenopodium quinoa</i>			Infección con Virus del mosaico del bambú	Pollo (IM)	(Chen et al., 2012)	
			<i>Nicotiana benthamiana</i>	Expresión transitoria	Pollo (IM)	(Gomez et al., 2013)
Cerdo	Virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV)	S	<i>Zea mays</i> (Semillas)	Plantas transgénicas	Ratón, Cerdos (O)	(Streatfield et al., 2001)
			<i>Zea mays</i> (Semillas)	Plantas transgénicas	Cerdos (O)	(Lamphear et al., 2004)
Conejo	Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHVD)	VP60	<i>Solanum tuberosum</i> (Hoja)	Plantas transgénicas	Conejo (SC, IM)	(Castanon et al., 1999)
			<i>Solanum tuberosum</i> (Tubérculo)	Plantas transgénicas	Conejo (IM)	(Martin-Alonso et al., 2003)
Perro	Parvovirus Canino	2L21	<i>Nicotiana tabacum</i>	Plantas transplastómicas	Ratón (IP, P, IG), Conejo (P)	(Molina et al., 2004; Molina et al., 2005)

Tabla 1. Algunos de los ejemplos más significativos de *molecular farming* en plantas para la producción de antígenos de interés veterinario. Se detallan las especies animales, los antígenos virales producidos, las especies vegetales transformadas, los métodos de transformación empleados y los modelos animales en los que se evaluó exitosamente la inmunogenicidad de los antígenos recombinantes. Se resaltaron los trabajos llevados a cabo por nuestro grupo en plantas transplastómicas. Se incluyen las vías de administración de los antígenos (O: oral, IG: intragástrica, IM: intramuscular, IP: intraperitoneal, SC: subcutánea, P: parenteral). Adaptada de (Liew and Hair-Bejo, 2015; Ruiz et al., 2015).

Dado que el nivel de expresión de los antígenos recombinantes es un factor crucial del cual depende la factibilidad económica del sistema de producción, las plantas transplastómicas resultan una alternativa aún más interesante. Estas no solo requieren tiempos menores para su caracterización sino que además permiten obtener niveles de expresión varios ordenes de magnitud superiores respecto a los que se observan en plantas transgénicas nucleares (Floss et al., 2007; Mason et al., 2002; Rybicki, 2010). Existen diversos trabajos de *molecular farming* de antígenos vacunales de uso veterinario en plástidos que también han sido validados en modelos animales. Algunos ejemplos de antígenos virales producidos en cloroplastos se observan en la **tabla 1**. Por otro lado, existen trabajos que abarcan otro tipo de antígenos bacterianos en cloroplastos como la subunidad B de la toxina colérica (CTB), FaeG de fimbrias de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), el antígeno protector (PA) de *Bacillus anthracis*, la subunidad B de la toxina lábil al calor de *E. coli*, entre otros (Daniell et al., 2001a; Kang et al., 2004; Kang et al., 2003; Kolotilin et al., 2012; Koya et al., 2005; Shen et al., 2010; Watson et al., 2004).

Otra estrategia alternativa en plantas es la producción de anticuerpos recombinantes, los cuales pueden ser administrados por vía oral como terapéuticos o para conferir protección pasiva frente a la infección. Varios trabajos han reportado la producción de anticuerpos de tipo scFv, IgA y VHH, y sus fusiones derivadas, en plantas (Fischer et al., 2004; Floss et al., 2007; Lentz et al., 2012).

A pesar de que se cuenta con muchos resultados alentadores de ensayos de expresión e inmunización animal, todavía no se cuenta con una vacuna de uso veterinario producida en cloroplastos en el mercado (Bock, 2015).

Usando el vector pBSW5'UTR, nuestro grupo ha sido capaz de expresar exitosamente en plantas transplastómicas varias proteínas de interés veterinario. Nuestro grupo cuenta con experiencia en la producción de antígenos vacunales virales y nanoanticuerpos (anticuerpos de dominio simple) de interés veterinario, en plantas transplastómicas. Por un lado se expresó un epítipo del antígeno VP1 de FMDV fusionado a la proteína GUS (Lentz et al., 2009) y, además, en otro trabajo se expresó en el mismo sistema el antígeno VP8 de cápside de BRV (Lentz et al., 2011)(**Tabla 1**). Ambos antígenos virales resultaron inmunogénicos en un modelo de ratón. Adicionalmente, en el caso de VP8, los anticuerpos IgG producidos luego de la inmunización permitieron proteger de manera pasiva a las crías en un modelo de ratón lactante.

Por otra parte, el grupo dirigido por el Dr. Wigdrovitz, del Instituto de Virología del INTA-Castelar, también cuenta con experiencia en *molecular farming* a partir de plantas

transgénicas. Este grupo ha transformado con éxito alfalfa para la producción de antígenos de FMDV, BVDV y BRV. En los casos de FMDV y BRV se demostró la inmunogenicidad y protección de los antígenos en un modelo murino (Dus Santos et al., 2005; Dus Santos et al., 2002; Wigdorovitz et al., 1999; Wigdorovitz et al., 2004). Además, en el caso de BVDV la proteína recombinante resultó inmunogénica y protectora en bovinos (Perez Aguirreburualde et al., 2013). Fue precisamente a partir de nuestra colaboración con este grupo, y basándonos en sus trabajos previos, que pudimos demostrar la capacidad de las plantas transplastómicas para producir niveles de expresión notablemente mayores de algunos de estos antígenos en cloroplastos.

El presente trabajo de tesis está dedicado a ahondar la colaboración entre ambos grupos para la producción de antígenos de interés veterinario de bajo costo derivando en un potencial candidato para una vacuna comercial de uso en la industria veterinaria.

El trabajo está dividido en tres secciones:

En las primeras dos secciones se presentan los resultados de la generación de plantas transplastómicas de tabaco expresando antígenos vacunales de interés veterinario fusionados a la proteína decamérica y altamente inmunogénica lumazina sintasa de *Brucella* spp (BLS).

Brevemente, la proteína BLS permite fusionar otras proteínas a su extremo N-terminal para luego plegarse como un dímero de pentámeros altamente estable. Funciona como adyuvante y presentador, incrementando marcadamente la inmunogenicidad de los péptidos a los que está unido covalentemente (Berguer et al., 2006; Craig et al., 2005; Velikovskiy et al., 2002; Zylberman et al., 2004).

Rotavirus es la principal causa de diarrea en terneros y potrillos recién nacidos, ocasionando importantes pérdidas económicas a nivel mundial. Dado que las crías recién nacidas son particularmente susceptibles a ser infectadas, resulta esencial contar con estrategias de inmunización destinadas a estimular la inmunidad pasiva por la transmisión de anticuerpos del calostro y la leche originados a su vez por la vacunación activa de las madres (Fernandez et al., 1998; Garaicoechea et al., 2006; Saif et al., 1994; Saif and Fernandez, 1996).

La proteína VP8* surge del clivaje proteolítico de VP4 de la cápside de rotavirus. Se trata de una proteína no glicosilada que constituye un determinante importante de infectividad viral. La proteína VP8 resulta particularmente atractiva para el desarrollo de vacunas recombinantes a subunidad ya que presenta epitopes capaces de generar anticuerpos

de tipo neutralizante (Kalica et al., 1983; Ruggeri and Greenberg, 1991; Stencel-Baerenwald et al., 2014).

En la primera sección se muestran los resultados correspondientes a la expresión en plantas transplastómicas de tabaco de la proteína VP8d (fragmento menor de VP8*) de Rotavirus Bovino (RVB), cepa C486 fusionada a BLS (Dormitzer et al., 2002).

En los últimos años en la Argentina, pese a que se cuenta con una vacuna comercial formulada con rotavirus equino inactivado, se ha registrado un aumento considerable en la incidencia de gastroenteritis ocasionada por otras variantes de rotavirus equino para los cuales la vacuna no resulta protectora (Barrandeguy et al., 1998; Garaicoechea et al., 2011). Resulta entonces de particular interés la formulación de una vacuna recombinante a subunidad que permita conferir inmunidad frente a los diferentes serotipos circulantes en la actualidad. Es importante mencionar también la necesidad del mercado de contar con este tipo de vacuna y el alto poder adquisitivo del mismo.

En la segunda sección se muestran los resultados correspondientes a la expresión en plantas transplastómicas de tabaco de la proteína VP8d de Rotavirus Equino (RVE), cepa H2 tanto sola como fusionada a BLS.

Desde hace varios años, por cuestiones vinculadas a bioseguridad y percepción pública, existe una tendencia a intentar evitar el uso de genes de resistencia a antibióticos para la generación de plantas transplastómicas. En su lugar han sido propuestos numerosos y novedosos esquemas de selección (Breyer et al., 2014). De acuerdo con esta corriente de pensamiento, en la última sección de la presente tesis se detallan los esfuerzos para generar un vector de transformación de cloroplastos de tabaco que portara un gen que permitiera la selección de las plantas transformadas por tolerancia a estrés. Como gen selector se eligió a flavodoxina de *Anabaena* sp., el cual codifica un transportador de electrones que contiene una molécula de flavina como grupo prostético. Su presencia está restringida a los procariotas y algunas algas eucariotas, observándose en cianobacterias aumentos drásticos de sus niveles cuando son expuestas al herbicida metil viológeno y a otros compuestos propagadores de superóxidos. Ya ha sido descrito que en plantas transgénicas de tabaco la expresión de flavodoxina resulta en una mayor tolerancia a estrés oxidativo y a un amplio rango de desafíos ambientales (temperatura, UV, salinidad, patógenos, entre otros) (Tognetti et al., 2007a; Tognetti et al., 2006; Tognetti et al., 2007b; Zurbriggen et al., 2009; Zurbriggen et al., 2008). Por lo tanto, en la tercera sección de la presente tesis se muestran los resultados

correspondientes a la evaluación de sustancias que provoquen estrés oxidativo (Metil viológeno) o salino (NaCl) como agentes selectores.

Hipótesis general

La hipótesis principal de este trabajo postula que es posible generar plantas transplastómicas de tabaco y obtener vacunas experimentales a partir de la expresión de fusiones antigénicas de interés veterinario a la proteína decamérica y altamente inmunogénica lumazina sintasa de *Brucella* spp (BLS).

De manera complementaria se pretendió utilizar el gen de flavodoxina de *Anabaena* sp. como gen selector para reemplazar el uso de antibióticos por estrés abiótico en el esquema de selección de plantas transplastómicas.

Objetivos particulares

A) Obtener vacunas experimentales a partir de plantas transplastómicas de tabaco que expresen:

-La proteína VP8d (fragmento de VP8*) de Rotavirus Bovino (RVB), cepa C486 fusionada a BLS (BLSVP8d-Bov).

-La proteína VP8d (fragmento de VP8*) de Rotavirus Equino (RVE), cepa H2 fusionada a BLS (BLSVP8d-Eq).

-La proteína VP8d (fragmento de VP8*) de Rotavirus Equino (RVE), cepa H2.

B) Caracterizar molecularmente las plantas obtenidas (*Southern, northern y western blot*)

C) Evaluar la respuesta inmune obtenida luego de inocular las proteínas recombinantes en gallinas ponedoras.

D) En el caso de BLSVP8d-Bov, comparar los niveles de expresión y la respuesta inmune conferida por esta fusión con lo logrado previamente al expresar solamente VP8* Bovina no fusionada.

E) En el caso de BLSVP8d-Eq, comparar los niveles de expresión y la respuesta inmune conferida por esta fusión con lo logrado al expresar solamente VP8d-Eq no fusionada.

F) De manera complementaria, realizar curvas de regeneración con explantos de *N. tabacum* sin transformar y transformados con flavodoxina en presencia de distintas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) o del herbicida metil viológeno (MV) como agentes selectores para establecer la sensibilidad del tejido a esas condiciones de cultivo.

G) Realizar experimentos de transformación de cloroplastos con un vector conteniendo flavodoxina como gen selector utilizando en el medio de cultivo NaCl o Metil viológeno como agentes selectores y comparar los resultados con los obtenidos al utilizar espectinomicina.

RESULTADOS

PARTE I: Expresión en cloroplastos de tabaco del antígeno VP8d de Rotavirus Bovino fusionado a la enzima lumazina sintasa de *Brucella Spp.*

Introducción

Rotavirus es la principal causa de gastroenteritis severa en mamíferos recién nacidos y causa pérdidas económicas muy importantes alrededor del mundo (Saif and Fernandez, 1996). De acuerdo con un seguimiento realizado durante 10 años, desde 1994 hasta 2003, el Rotavirus Bovino (BRV) del Grupo A es la principal causa de diarrea neonatal en terneros en Argentina, siendo responsable de pérdidas económicas sustanciales en relación a la industria de la carne y láctea (Garaicoechea et al., 2006). Los terneros son particularmente susceptibles a la infección con rotavirus durante las primeras semanas de vida y por esta razón, teniendo en cuenta el impacto económico de esta enfermedad a nivel productivo, es esencial contar con un sistema de inmunización pasiva que comprenda la transmisión de anticuerpos del calostro y la leche originados por la vacunación activa de sus madres (Fernandez et al., 1998).

BRV está compuesto por 11 segmentos de ARN de doble cadena, contenidos en un núcleo interno, rodeados por dos capas proteicas que constituyen la cápside viral. A su vez, la capa más externa está formada por dos proteínas diferentes, VP7 y VP4 (Estes et al., 2001). Esta última proteína está dimerizada y expuesta en la superficie del virión formando las espículas características de los rotavirus (**Figura 4**), posee actividad hemaglutinante y participa del proceso de adsorción viral (Crawford et al., 1994; Kalica et al., 1983). VP4 es posteriormente clivada por enzimas proteolíticas en el tracto gastrointestinal para dar lugar a VP8 y VP5, siendo el dominio no glicosilado de VP8 (**Figura 4**) el responsable de la adhesión viral a residuos de ácido siálico en las células del hospedador (Stencel-Baerenwald et al., 2014). Además, por presentar epítopes neutralizantes VP8 representa un candidato atractivo para el desarrollo de vacunas recombinantes (Ruggeri and Greenberg, 1991).

La proteína VP8* (**Figura 5**) de Rotavirus Bovino C486 fue expresada previamente por nuestro grupo en cloroplastos de tabaco. En esta organela la expresión se dio principalmente en forma de agregados insolubles, alcanzándose buenos niveles de expresión de alrededor del 4% de las Proteínas Solubles Totales (PST). La proteína VP8* producida en plantas fue capaz de conferir una fuerte respuesta inmune luego de ser inyectada en ratones hembra. Asimismo, las crías nacidas a partir de los ratones inmunizados también resultaron protegidas, gracias a la transmisión pasiva de anticuerpos en la leche, frente a desafío oral con rotavirus virulento (Lentz et al., 2011).

Basada en sus propiedades fisicoquímicas e inmunogénicas, la enzima lumazina sintasa de *Brucella* spp (BLS) (**Figura 6**) ha sido descrita como una proteína novedosa para la presentación de antígenos. BLS se pliega como un dímero de pentámeros altamente estable, exponiendo en cada subunidad un extremo N-terminal al que pueden fusionarse polipéptidos o dominios proteicos recombinantes sin afectar el plegamiento y la estabilidad general del decámero (Zylberman et al., 2004). Esta característica pudo ser confirmada por los análisis estructurales de las quimeras resultantes. La estructura general y las características de BLS son semejantes a las de la subunidad B de la toxina colérica (CTB) y la subunidad B de la toxina lábil al calor de *E. coli* (LTB), las cuales han sido ampliamente utilizadas como potentes adyuvantes para incrementar la respuesta inmune de antígenos recombinantes cuando se las acopla a ellos. De hecho, ambas subunidades adyuvantes ya han sido expresadas en forma de fusiones inmunogénicas en plantas transplastómicas (Lakshmi et al., 2013; Waheed et al., 2011). Asimismo, BLS también se comporta como un potente inmunomodulador (Berguer et al., 2006; Velikovskiy et al., 2002), siendo capaz de inducir respuestas tanto de tipo humoral como celular (Velikovskiy et al., 2003). Es importante destacar que las propiedades inmunogénicas de BLS solo se hacen evidentes cuando se la expresa como una fusión y no cuando se la expresa en forma conjunta con el antígeno (Craig et al., 2005). Debido a su multivalencia y a sus propiedades inmunogénicas, se ha demostrado que BLS es eficiente como presentador y adyuvante tanto en la inmunización sistémica como en la oral (Fragoso et al., 2011; Rosas et al., 2006). Más específicamente, nuestro grupo de investigación fusionó el N-terminal de BLS a un dominio interno de la proteína VP8 (VP8d) (Dormitzer et al., 2002). La fusión resultante (BLSVP8d) se expresó en *E. coli*, donde se confirmó su correcto plegamiento y ensamblaje decamérico, obteniéndose títulos de anticuerpos mayores a los obtenidos al inmunizar VP8d sola o una mezcla de VP8d y BLS, tanto en un modelo de ratón lactante como en un modelo de gallina ponedora. En el primer caso, los ratones lactantes nacidos a partir de hembras inmunizadas resultaron protegidos frente al desafío oral con rotavirus virulento (Bellido et al., 2009). Por otro lado, en el caso de las gallinas se generaron anticuerpos de tipo IgY específicos contra rotavirus a partir de la yema de huevos de gallinas inmunizadas. La administración oral de estos anticuerpos permitió proteger a ratones, de manera dosis dependiente, frente a un desafío oral posterior con BRV (Bellido et al., 2012).

Es por todos estos antecedentes que se decidió evaluar por primera vez, durante el desarrollo de la presente tesis, la plataforma de BLS de *Brucella* spp en un sistema de expresión de planta. Para ello se buscó expresar inicialmente la fusión BLSVP8d en cloroplastos

de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana) para evaluar el posible uso de fusiones antigénicas a BLS para el desarrollo de vacunas recombinantes en plantas.

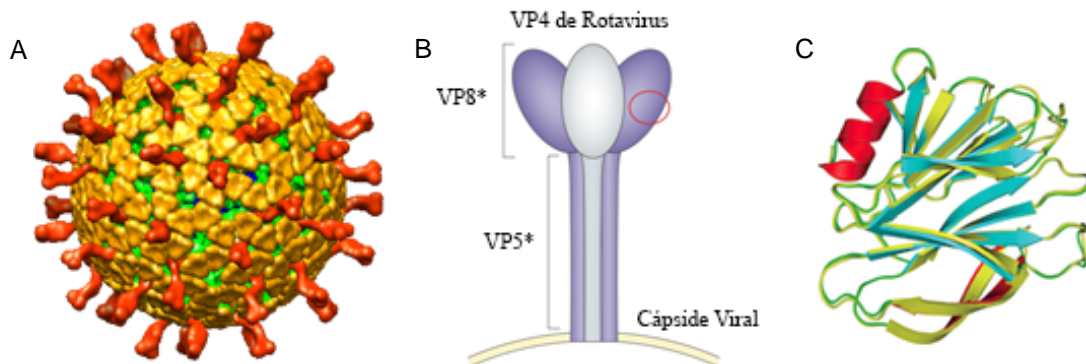


Figura 4. Estructura del rotavirus y el antígeno VP8*. (A) Estructura del virión de rotavirus de macaco *Rhesus* (resolución: 23 Å), obtenida mediante crioelectromicroscopía y procesamiento de imágenes por computadora. El diámetro de la partícula es de 1000 Å. Las espículas compuestas por trímeros de VP4 se encuentran coloreadas en rojo. Tomado de (Venkataram Prasad and Estes, 2000). (B) Modelo de VP4 en el cual se indica el producto de corte por tripsina en VP5* y VP8*. La proteína es un trímero pero solo dos de los tres monómeros son visibles en algunas estructuras, por lo cual el tercer monómero se muestra en gris. Se indica con un círculo el sitio de unión a glicanos de la subunidad VP8*. La subunidad VP5* facilita la penetración de la membrana. Tomado de (Stencel-Baerenwald et al., 2014). (C) Estructura de VP8* de rotavirus de macaco *Rhesus*. Tomado de (Yu et al., 2015).

MASLIYRQLLTNSYTVELSDEIQEIGSTKTQNVTVNPGPFAQTNYASVNWGPGETNDSTTVEPVLDPYQPT
 TFNPPVSYWMLLAPTNAAGVVDQGTNNTNRWLATILIKPNVQQVERTYTLFGQQVQVTVSNDSQTKWKFL
 DLSKQTQDGNYSQHGPLLSTPKLYGVMKHGGKIYTNGETPNATTGYYSTNFDTVNMATAYCDFYIPLAQ
 EAKCTEYINNGLPPIQNTRNIVPVSIVSRNIVYTRAQPNQDIVVSKTSLWKEMQYNRDIVIRFKANSIIKSGGL
 GYKWSEVSFKPANYQTYTRDGEEVTAHTTCSVNGINDFNNGGSLPTDFVISKEYEVIKENSFYIDYWDSS
 QAFRNMVYVRSALADLNSVMCTGGDYSFAIPVGNYPVMTGGAVSLHSAGVTLSTQFTDFVSLNSLRFRL
 SVEEPPFSILRTRVSGLYGLAAKPNNSQEYIEIAGRFSLISLVPSNDDYQTPIINSVTVRQDLERQLGELRDEFN
 NLSQQIAMSQILIDLALLPLDMFSMFGIKSTIDAAKSMATNVMKRFKSSLANVSTLTDSLSDAASSISRSA
 SVRSVSSTASAWTEVSNITSDINVTSSISTQTSTISRRLRLKEMATQTDGMNFDDISAAVLKTKIDKSTQLNT
 NTLPEIVTEASEKFIPNRAYRVIKDDEVLEASTDGKYFAYKVETILKRFHSMYKFADLVTDSPVISAIIDFKTLKLN
 NDNYGISRQQALNLLRSDPRVLRFINQDNPIIRNRIESLIMQCRL

Figura 5. Secuencia aminoacídica correspondiente a la proteína VP4 de Rotavirus Bovino (RVB) cepa C486. Se muestra en azul la secuencia correspondiente a VP8 y en negro la correspondiente a VP5. En rojo se detallan los 3 posibles sitios de clivaje. Se señala subrayada la secuencia correspondiente a VP8* expresada previamente en plantas transplastómicas (Lentz et al., 2011). Se muestra resaltada en gris la secuencia correspondiente a VP8d.

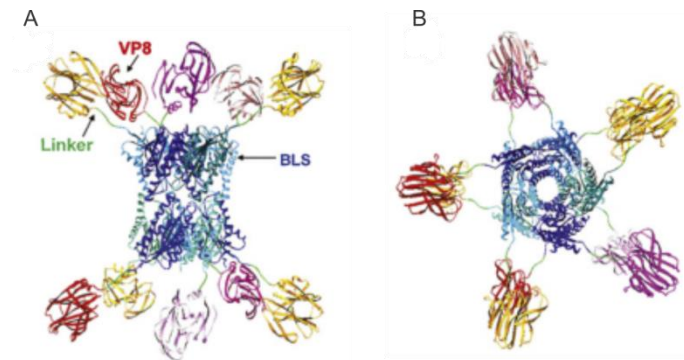


Figura 6. Estructura teórica del dímero de pentámeros de BLSVP8d. (A) Vista frontal. (B) Vista axial. BLS se muestra en colores azules, el *linker* en verde y VP8d en rojo/rosado. Adaptado de (Bellido et al., 2009)

Resultados Parte I

Subclonado de la secuencia BLSVP8d-Bov en el vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr

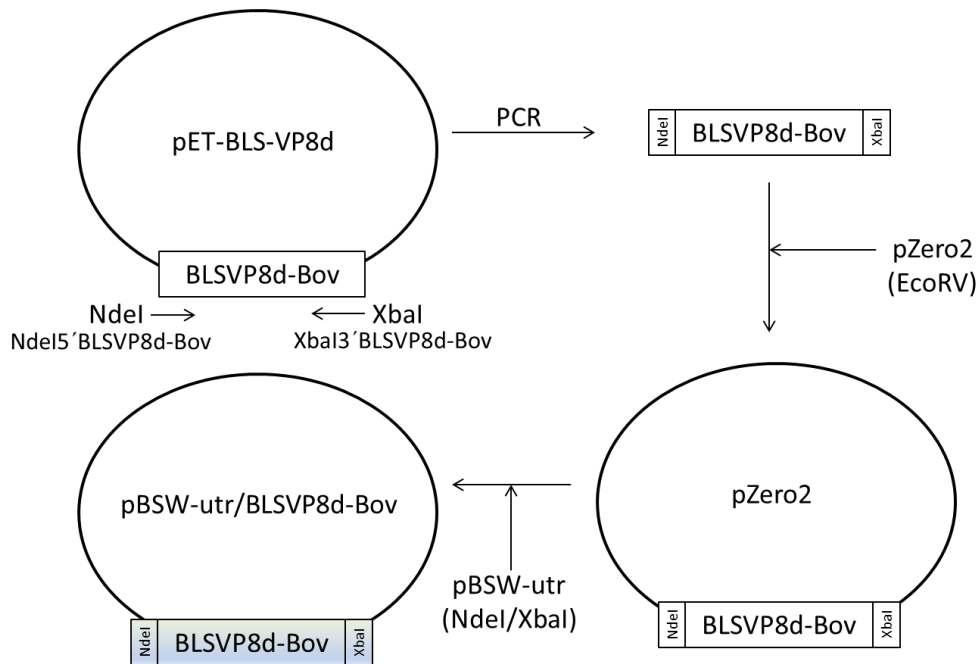


Figura 7. Estrategia de clonado empleada para generar el vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr/BLSVP8d-Bov. Se detallan de manera gráfica las diferentes etapas del clonado.

La secuencia BLSVP8d-Bov es una quimera que consiste en la fusión del *core* de VP8 (desde el nucleótido 184 al 672 del gen de VP4 de Rotavirus bovino) mediante el pentapéptido GSGSG al extremo N-terminal de la enzima lumazina sintasa de *Brucella* spp. Esta secuencia quimérica se obtuvo por amplificación por PCR a partir del plásmido pET-BLS-VP8d (Bellido et al., 2009). El producto de amplificación obtenido se subclonó en el vector de transformación de cloroplastos, dando como resultado el vector pBSW-utr/BLSVP8d-Bov. Para ello se empleó la enzima *Pfu* y los oligonucleótidos iniciadores NdeI5' BLSVP8d-Bov y XbaI3' BLSVP8d-Bov, los cuales permitieron agregar a la fusión los sitios de restricción NdeI y XbaI, respectivamente. El producto de PCR de extremos romos fue clonado en el vector pZErO-2, el cual fue previamente digerido con la enzima de restricción EcoRV. Posteriormente, el vector intermediario resultante fue digerido totalmente con la enzima XbaI y parcialmente con la enzima NdeI, de manera de poder liberar un fragmento conteniendo la secuencia codificante completa para BLSVP8d. En este vector la secuencia reconocida por XbaI inmediatamente después del codón de terminación se hallaba metilada, por lo cual la enzima realizó un corte 40 nucleótidos río

abajo en una secuencia interna del vector, no viéndose afectada la integridad de la secuencia codificante. El fragmento liberado fue finalmente ligado al vector pBSW-utr, siendo este último obtenido a partir de la digestión previa del vector pBSW-utr/hEGF (Wirth et al., 2006) con las enzimas NdeI y XbaI de manera de remover la secuencia codificante para hEGF. Se denominó al vector resultante como pBSW-utr/BLSVP8d-Bov (**Figura 7**).

Los clones recombinantes fueron identificados mediante una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos usados anteriormente durante el clonado (NdeI5´BLSVP8d-Bov y XbaI3´BLSVP8d-Bov). Como control negativo se empleó ADN del plásmido pBSW-utr/VP8*. La integridad de los clones positivos seleccionados fue corroborada mediante secuenciación para descartar la introducción de mutaciones durante la amplificación por PCR.

Dado que los plástidos derivan evolutivamente de cianobacterias, los elementos del vector de transformación de cloroplastos pueden ser reconocidos por la maquinaria transcripcional y traduccional procariota. Es por esto que antes de proceder con la transformación de cloroplastos se realizó un ensayo preliminar de expresión utilizando *E. coli* transformada con el vector pBSW-utr/BLSVP8d-Bov. La expresión fue corroborada mediante la técnica de *western blot*. Para ello se obtuvieron extractos proteicos totales y se emplearon anticuerpos obtenidos de ratones inmunizados con VP8* de rotavirus bovino. De este modo se confirmó el ensamblado correcto del vector y la expresión de BLSVP8d. Llamativamente la proteína recombinante fue detectada en niveles muy altos en citosol bacteriano (**Figura 8**).

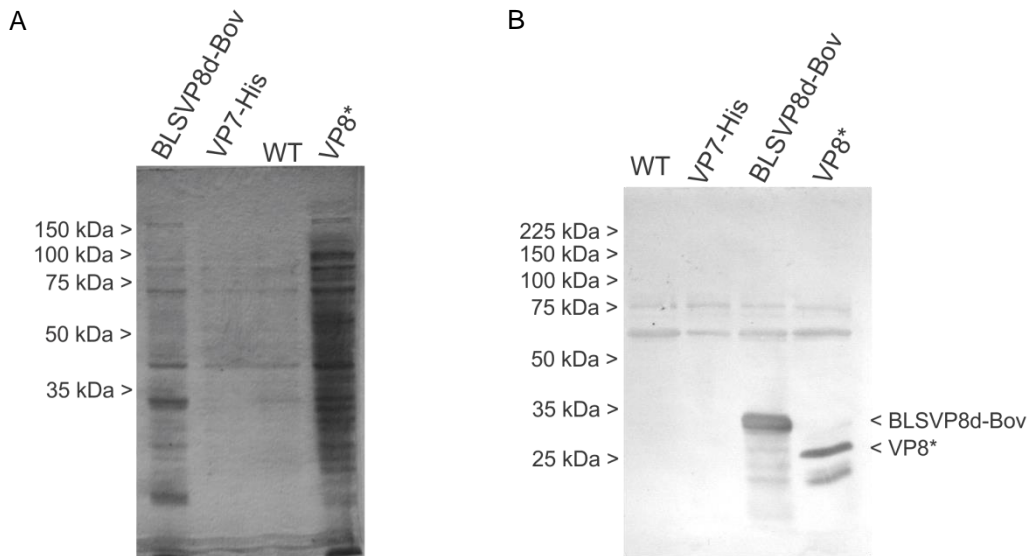


Figura 8. Análisis de la integridad y capacidad de expresión del vector pBSW-utr/BLSVP8d-Bov en *E. coli*. (A) Gel SDS-PAGE 10% teñido con *Coomassie brilliant blue*. (B) *Western blot* revelado con anticuerpos contra VP8* de rotavirus bovino. Se incluyó un extracto obtenido a partir de bacterias transformadas con la construcción pBSW-utr/VP8* como control positivo. Se indica la posición de BLSVP8d-Bov y VP8*. En ambos casos se incluyeron como controles negativos bacterias *E. coli* sin transformar y transformadas con un vector que expresa una proteína no relacionada (VP7-His). Se indican en los márgenes las posiciones de BLSVP8d-Bov, VP8* y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega).

Transformación de cloroplastos de tabaco con el vector pBSW-utr/BLSVP8d-Bov

La obtención de las líneas transplastómicas se realizó por medio de la técnica de bombardeo de fragmentos de hojas de *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana empleando micropartículas de oro recubiertas con la construcción pBSW-utr/BLSVP8d-Bov. Los fragmentos de hojas bombardeadas (explantos) regeneraron en medio RMOP en presencia de 500 mg/l de espectinomicina utilizada como agente selector. Los brotes que regeneraron en presencia del antibiótico fueron chequeados en primera instancia por PCR empleando los oligonucleótidos *Cloro fw* (localizado sobre el gen *rrn16* del genoma plasmídico) y *Cloro rev* (correspondiente a la secuencia *aadA* del vector de transformación). Solamente en las plantas en las que se produjo la integración de las secuencias recombinantes se obtuvo un producto de amplificación de 1450 pb (Figura 9A). Se incluyó una muestra WT como control negativo. De esta manera se seleccionaron 3 eventos de transformación independientes, los cuales fueron sometidos a una caracterización más exhaustiva y posteriormente empleados en los ensayos de inmunización.

Con el fin de información específica del evento de transformación, se realizó una PCR sobre una de las 3 líneas empleando los oligonucleótidos NdeI5´BLSVP8d-Bov y XbaI3´BLSVP8d-Bov, los cuales amplifican la secuencia de interés introducida (BLSVP8d-Bov). Se incluyeron muestras transformadas con otra construcción como control negativo. Como control positivo se empleó ADN del plásmido-vector utilizado en la transformación. De esta manera se obtuvo para esta línea y el control positivo un producto de amplificación de aproximadamente 750 pb y se demostró de forma inequívoca que el evento de recombinación contenía el gen de interés (**Figura 9B**).

En la **figura 9C** se esquematiza la región del genoma plasmídico donde ocurre la integración por recombinación homóloga y el producto final de recombinación. Se muestran también los sitios de hibridación de los oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR.

Con el fin de lograr la homoplasia, es decir que todas las copias del genoma plasmídico presentaran integradas las secuencias de interés, fragmentos de hoja de las plantas obtenidas fueron sometidos a dos rondas adicionales de regeneración en presencia del agente selector para garantizar la homoplasia. Finalmente las plantas fueron rusticadas y se desarrollaron normalmente, siendo prácticamente indistinguibles de plantas de tabaco no transformadas. Esta característica no interfirió de ninguna manera en el desarrollo normal de las plantas (**Figura 10**).

Las semillas obtenidas a partir de las plantas transplastómicas pudieron germinar y crecer en presencia de espectinomicina, lo cual confirmó la estabilidad de la integración de los transgenes en el genoma plasmídico. Como control de germinación se emplearon semillas provenientes de plantas sin transformar. Estas últimas no fueron capaces de desarrollarse en presencia de espectinomicina y solo pudieron hacerlo en el control sin antibiótico (**Figura 10**).

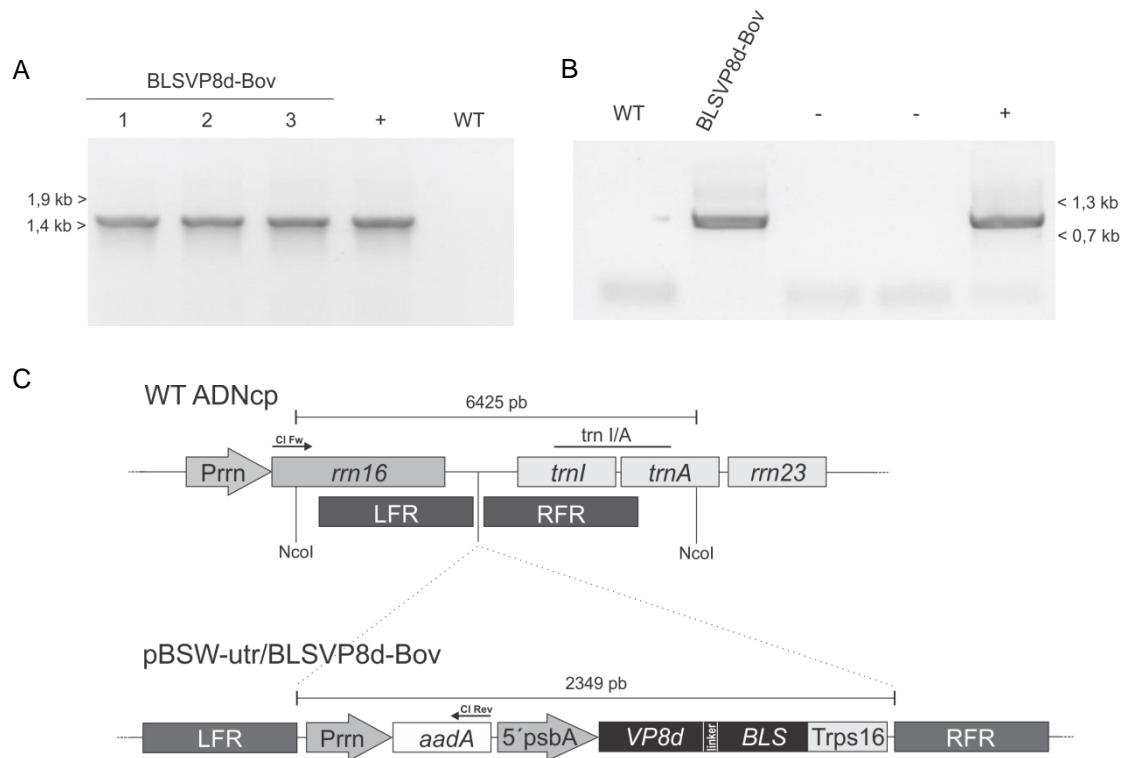


Figura 9. Identificación de las líneas transplastómicas por PCR. (A) Análisis por PCR empleando oligonucleótidos iniciadores Cloro Fw y Rev para confirmar la integración de los transgenes. 1, 2 y 3: líneas independientes. Control positivo: +. Controles negativos: -. (B) Análisis por PCR empleando los oligonucleótidos iniciadores NdeI5'BLSVP8d-Bov y XbaI3'BLSVP8d-Bov. Se incluye en los márgenes la posición del marcador de peso molecular (λ DNA-BstEII Digest, New England Biolabs). (C) Esquema del sitio de integración en el genoma plastídico. Se muestran en la figura los oligonucleótidos utilizados para la PCR que permite amplificar un fragmento de 1450 pb solo en las plantas transplastómicas. Se señalan los sitios de corte de la enzima NcoI empleada en el ensayo de *Southern blot*. El vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr/BLSVP8d-Bov contiene la secuencia de VP8d fusionada mediante un *linker* a la secuencia de lumazina sintasa. LFR y RFR: flancos izquierdo y derecho de recombinación, respectivamente. 5'psbA: secuencia no traducible y promotor fuerte del gen psbA. *trnI/A*: sonda utilizada en los ensayos de *Southern blot*.

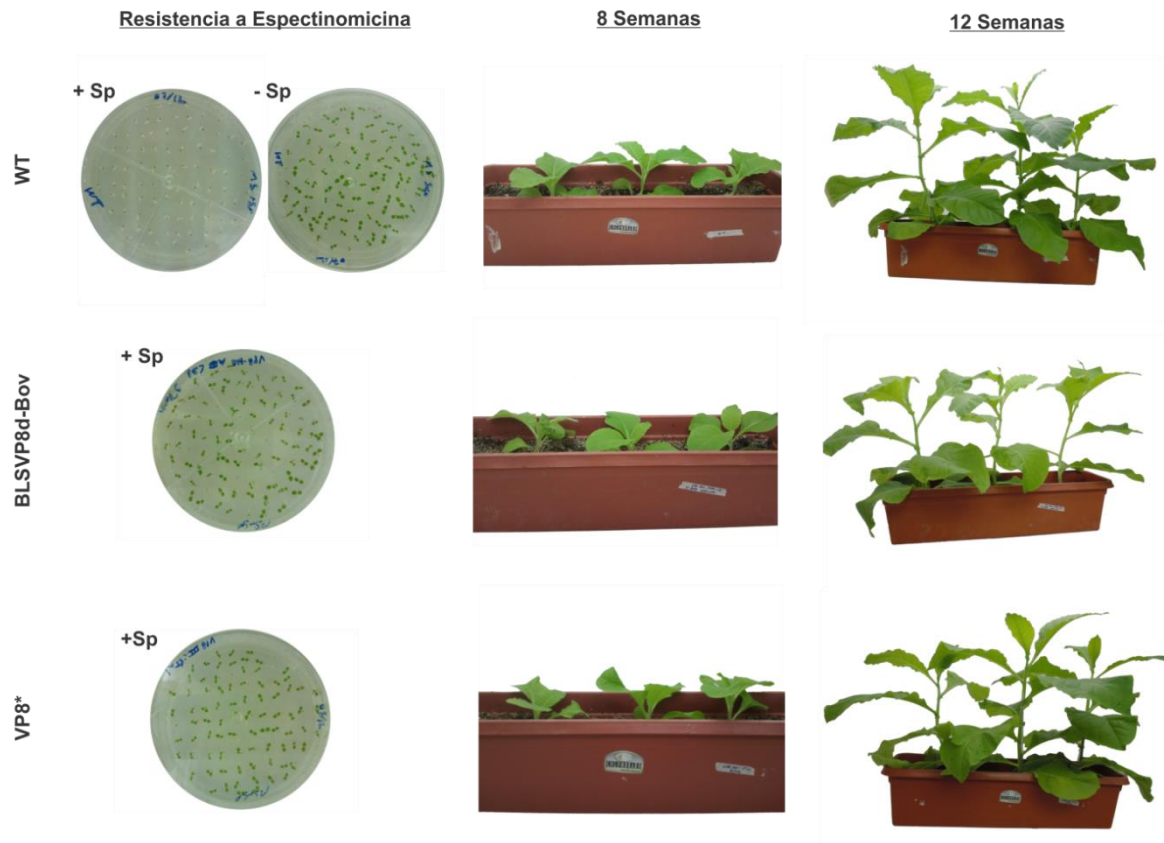


Figura 10. Caracterización fenotípica de las plantas transplastómicas. Ensayo de germinación luego de 10 días de sembradas las semillas en presencia del agente selector espectinomicina (Sp, 500 mg/l) en el cual solo pudieron desarrollarse con normalidad las semillas provenientes de plantas transplastómicas. Una vez germinadas las plantas se transfirieron a invernadero en donde se registró el fenotipo a las 8 y 12 semanas post-siembra.

Análisis de la integración del transgén y estado homoplástico

ADN obtenido de las plantas previamente caracterizadas por PCR y germinadas en espectinomicina fue utilizado en ensayos de *Southern blot* para corroborar la integración estable en el genoma plastídico. Con este propósito, se digirió el ADN total proveniente de hoja con la enzima NcoI, la cual corta río arriba y río abajo del sitio de integración en el genoma plastídico. La enzima no presenta ningún sitio de corte adicional en el *cassette* integrado. Por lo tanto, se esperaba detectar bandas de 6,4 Kpb en el caso de las plantas no transformadas y de 8,8 Kpb en las plantas transplastómicas, respectivamente, cuando se utiliza una sonda dirigida contra la región *trnI/A*. El análisis por *Southern blot* confirmó la integración del transgén en todas las líneas evaluadas. También pudo observarse una banda muy tenue de alrededor de 6.4 Kpb, lo cual podría explicarse tanto por un estado residual heteroplástico (lo cual sería poco probable dado que estas líneas no solo se regeneraron

sucesivamente en presencia del agente selector, sino que también las semillas fueron germinadas bajo presión de selección) o por la presencia de copias adicionales de fragmentos de ADN plastídico *wild-type* insertados en el genoma nuclear (hecho que no sería poco común dado que la integración de ADN plastídico está bien documentada a lo largo de la evolución) (**Figura 11A**) (Ayliffe et al., 1998; Nakazono and Hirai, 1993; Ruf et al., 2000; Stern and Lonsdale, 1982).

Análisis de los transcriptos

Mediante la técnica de *northern blot* pudieron detectarse transcriptos de diferentes tamaños producto de la transcripción a partir de distintos promotores. Para ello se empleó una sonda homóloga contra la secuencia *bls*. En todas las líneas se detectaron 3 transcriptos mayoritarios (**Figura 11C**). El promotor fuerte inducible por luz *psbA* fue responsable del transcripto monocistrónico más pequeño y abundante. Por otro lado, el promotor *rrn* introducido que controla la transcripción conjunta de los genes *aadA* y *BLSVP8d-Bov* produjo un bicistrón de tamaño intermedio. La presencia de un transcripto policistrónico adicional de mayor tamaño pudo explicarse por la transcripción a partir del promotor endógeno *rrn* que se encuentra río arriba al sitio de recombinación. Los tamaños esperados eran de 1,2 Kpb para el transcripto monocistrónico; 2,2 Kpb para el dicistrónico y 3,8 Kpb para el mayor de todos (**Figura 11B**). Esta predicción resultó avalada mediante la comparación de la movilidad electroforética de los 3 transcriptos con respecto a los ARN ribosomales 25S y 16S (**Figura 11C**).

Dos de las muestras analizadas correspondían a líneas que pasaron por 3 rondas de regeneración y que luego dieron lugar a semillas que fueron germinadas (Muestras 1 y 2). La tercera muestra provino de una línea que paso por una sola ronda de regeneración y fue semillada y germinada (Muestra 3a). La cuarta muestra provino de la misma línea que la tercera pero que pasó por un estadio adicional de semillado y germinación (Muestra 3b). No se observaron diferencias entre muestras tanto en el *Southern* como en el *northern blot* (**Figura 11A y C**).

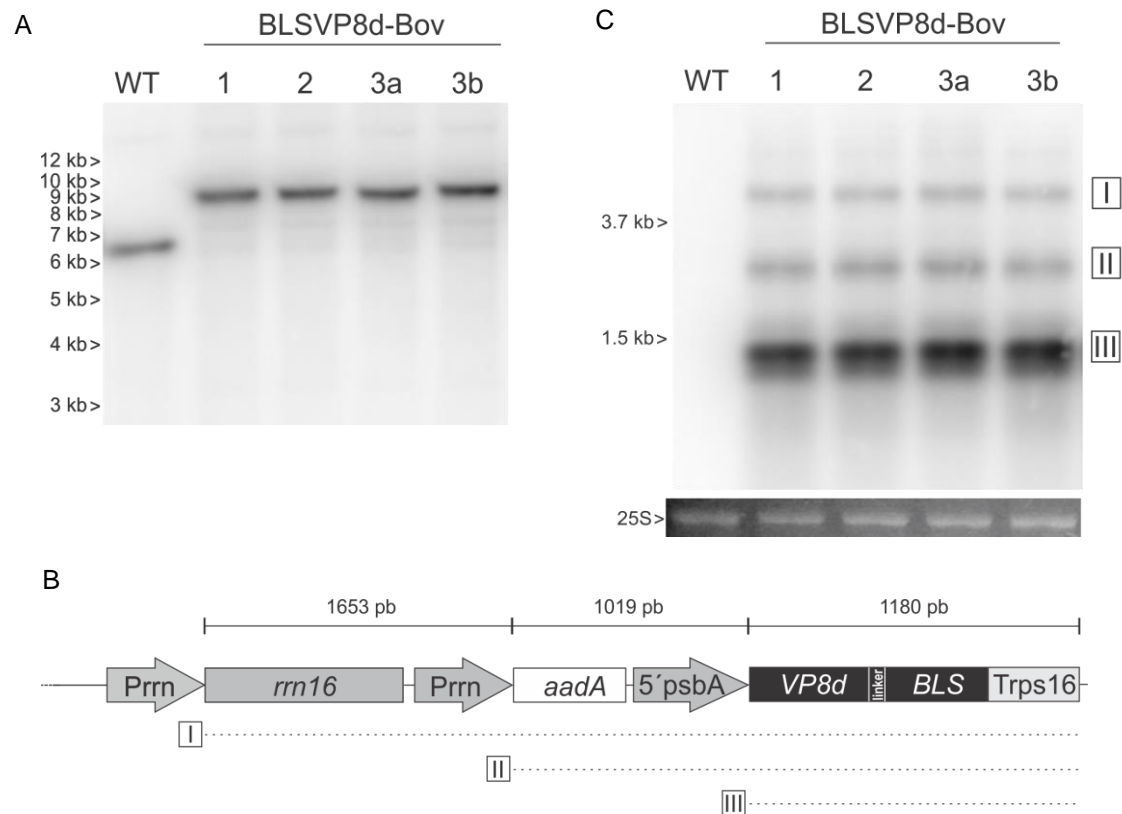


Figura 11. Caracterización molecular de las plantas transplastómicas expresando BLSVP8d-Bov. (A) *Southern blot* empleando una sonda contra *trnI/A* para confirmar la integración y estado homoplástico. (B) Mapa físico mostrando los tamaños esperados para los distintos transcritos. I: policistrón (3,8 kpb), II: dicistrón (2,2 Kpb), III: monocistrón (1,2 Kpb). (C) *Northern blot* empleando una sonda contra BLS mostrando los 3 transcritos mayoritarios detectados. Se muestra la banda correspondiente al ARN ribosomal 25S del gel antes de ser transferido como control de carga de las diferentes calles. 1, 2 y 3: líneas independientes. WT: *wild-type*. Se incluye en los márgenes la posición del marcador de peso molecular (1 KB, Invitrogen).

Expresión de BLSVP8d-Bov en plantas transplastómicas

Se analizó tanto por SDS-PAGE como por *western blot* la expresión de BLSVP8d-Bov en extractos proteicos totales provenientes de hojas de las diferentes líneas de plantas transplastómicas. En el gel teñido con *Coomassie brilliant blue* se pudo evidenciar para todas las líneas transplastómicas una banda diferencial de aproximadamente 35 kilodaltons (kDa) compatible con el tamaño esperado para BLSVP8d-Bov. Esta banda estaba ausente en el extracto obtenido a partir de hojas de una planta sin transformar. La identidad de esta banda diferencial se corroboró al realizar un ensayo de *western blot* usando anticuerpos contra VP8*, una versión algo más grande de VP8d de rotavirus bovino. Como control positivo se incluyó precisamente un extracto de una planta transplastómica que expresa VP8* previamente

obtenida en el laboratorio. Los niveles de expresión de BLSVP8d-Bov en los extractos totales fueron significativamente más altos cuando los extractos se prepararon a partir de plantas que pasaron por al menos un estadio de semilla luego de las sucesivas rondas de regeneración post-bombardeo, presumiblemente debido a un estado todavía heteroplástico de las plantas que aun no habían producido semilla (datos no mostrados). Los niveles de expresión de BLSVP8d-Bov fueron muy altos, siendo la banda correspondiente a BLSVP8d-Bov aún más intensa que la correspondiente a la subunidad mayor de Rubisco (RuBisCo, RbcL), la cual es normalmente la proteína más abundante en una hoja *wild-type*. Los niveles de expresión de BLSVP8d-Bov fueron claramente mayores a los de VP8*. (**Figura 12**).

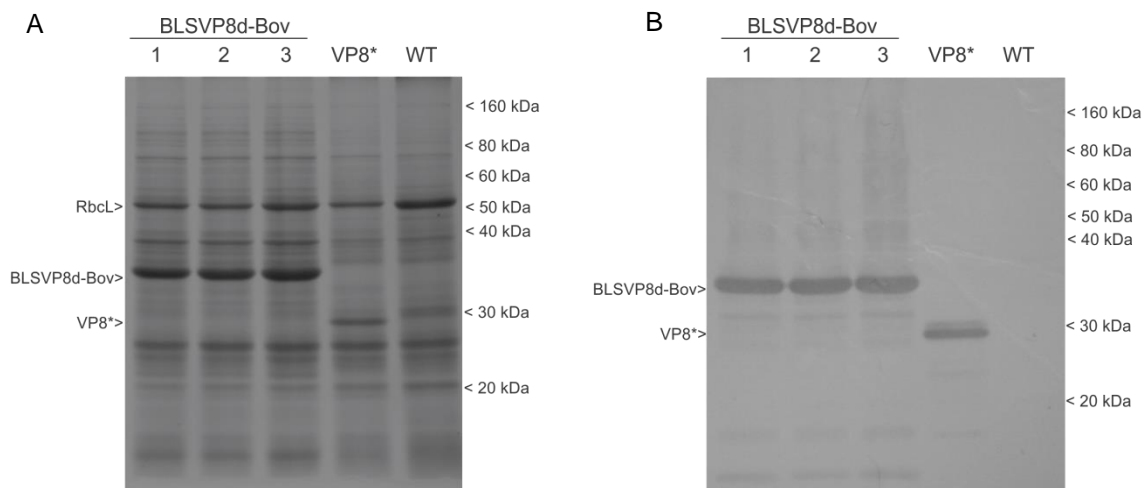


Figura 12. Expresión de BLSVP8d-Bov en las diferentes líneas transplastómicas. (A) Gel SDS-PAGE 10% teñido con *Coomassie brilliant blue* en el que se puede visualizar la expresión de BLSVP8d-Bov en tres líneas independientes. **(B)** *Western blot* revelado con anticuerpos contra VP8* de rotavirus bovino. Se indica la posición de BLSVP8d-Bov, VP8* y RbcL. En ambos casos se incluyeron como controles positivo y negativo extractos de hojas provenientes de una planta que expresa VP8* y una planta sin transformar, respectivamente. Todas las calles se sembraron con extractos proteicos provenientes de 2 mg de tejido fresco. Se indican en los márgenes las posiciones de BLSVP8d-Bov, VP8* y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega).

Análisis de la solubilidad de BLSVP8d-Bov en extractos de bacterias y plantas

Se había descrito con anterioridad la naturaleza insoluble de BLSVP8d-Bov al ser producida en *E. coli*. En este sistema la proteína recombinante tendía a formar cuerpos de inclusión insolubles (Bellido et al., 2009). Se analizó de manera preliminar el comportamiento de la proteína recombinante al ser expresada a partir del vector de transformación de

cloroplastos en *E. coli* y se corroboró que en efecto, y al igual que VP8*, la proteína se encontraba de manera mayoritaria en su forma insoluble (**Figura 13**).

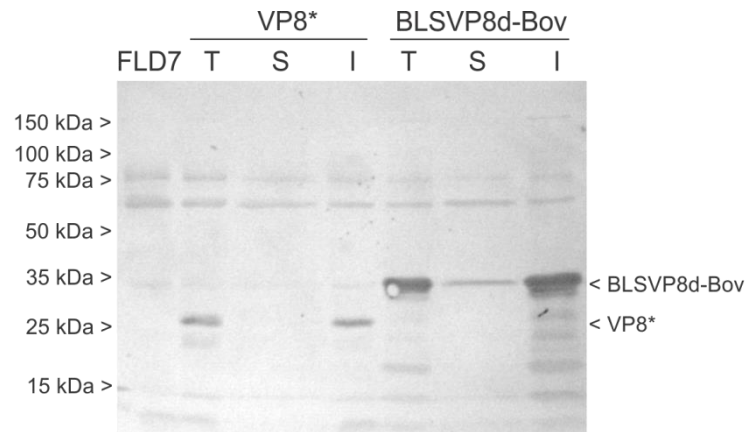


Figura 13. Análisis de la solubilidad de BLSVP8d-Bov en *E. coli*. *Western blot* revelado con anticuerpos contra VP8* de rotavirus bovino. Como control se analizaron en paralelo extractos obtenidos de bacterias transformadas con pBSW-utr/VP8*, previamente caracterizadas en el laboratorio. T, S, I: extractos total, soluble e insoluble, respectivamente. Se indican en los márgenes las posiciones de BLSVP8d-Bov, VP8* y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega). En cada calle se analizaron extractos equivalentes a aproximadamente 40 μ l de cultivo.

A continuación se procedió a analizar la solubilidad en los extractos de hojas de tabaco empleando el mismo sistema de extracción y buffer que en el caso de las bacterias. Se incluyeron como control de insolubilidad extractos obtenidos a partir de plantas expresando VP8* a nivel de cloroplasto, ya que la naturaleza insoluble de VP8* ya se encontraba descrita en esta organela (Lentz et al., 2011). Llamativamente, BLSVP8d-Bov se encontró de manera mayoritariamente soluble en el estroma de los cloroplastos, lo cual representó una situación totalmente novedosa y opuesta a la observada con anterioridad en *E. coli* (**Figura 14**).

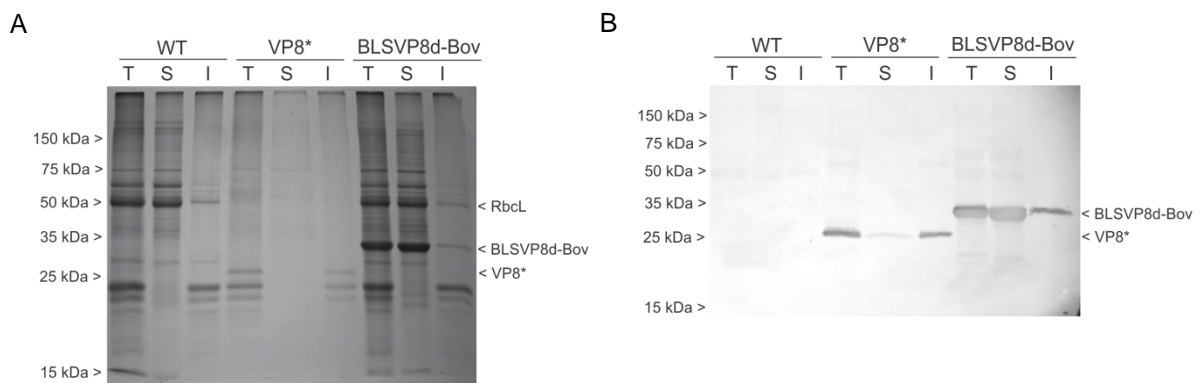


Figura 14. Análisis de la solubilidad de BLSVP8d-Bov en estroma de cloroplasto. (A) SDS-PAGE 12,5% teñido con *Coomassie brilliant blue*. **(B)** *Western blot* revelado con anticuerpos contra VP8* de rotavirus bovino. Como control de una proteína insoluble se analizaron en paralelo extractos obtenidos de hojas de plantas transformadas con pBSW-utr/VP8*. Como control negativo se utilizaron extractos *wild-type*. T, S, I: extractos total, soluble e insoluble, respectivamente. Se indican las posiciones de BLSVP8d-Bov, VP8* y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega). En cada calle se analizaron extractos obtenidos a partir de 2 mg de tejido fresco.

Acumulación y estabilidad de BLSVP8d-Bov a lo largo del desarrollo de las plantas transplastómicas

La disminución asociada con la edad en el contenido proteico de las hojas puede ser aprovechada para evaluar la estabilidad de las proteínas recombinantes producidas en una planta. Con el fin de evaluar la estabilidad de BLSVP8d-Bov, se analizaron tanto por SDS-PAGE como por *Western blot* extractos proteicos totales obtenidos a partir de hojas de diferente edad a lo largo de una misma planta transplastómica. La proteína recombinante se acumuló rápidamente en hojas jóvenes y se comportó de manera muy estable en hojas maduras e incluso en hojas senescentes, sin mostrar en ningún caso signos importantes de proteólisis. Los niveles más altos de expresión fueron observados en hojas de mayor edad ya que la subunidad mayor de RuBisCo y la mayoría del resto de las proteínas fueron gradualmente degradadas con la edad debido a mecanismos asociados a la senescencia. Los niveles observados para BLSVP8d-Bov fueron en todos los casos muy similares o incluso mayores a los de RuBisCo, normalmente la proteína más abundante en una hoja *wild-type*, dependiendo de la hoja seleccionada. Para la cuantificación posterior de los niveles de expresión de BLSVP8d-Bov se decidió emplear una hoja de edad intermedia, hoja # 7 en la **Figura 15**.

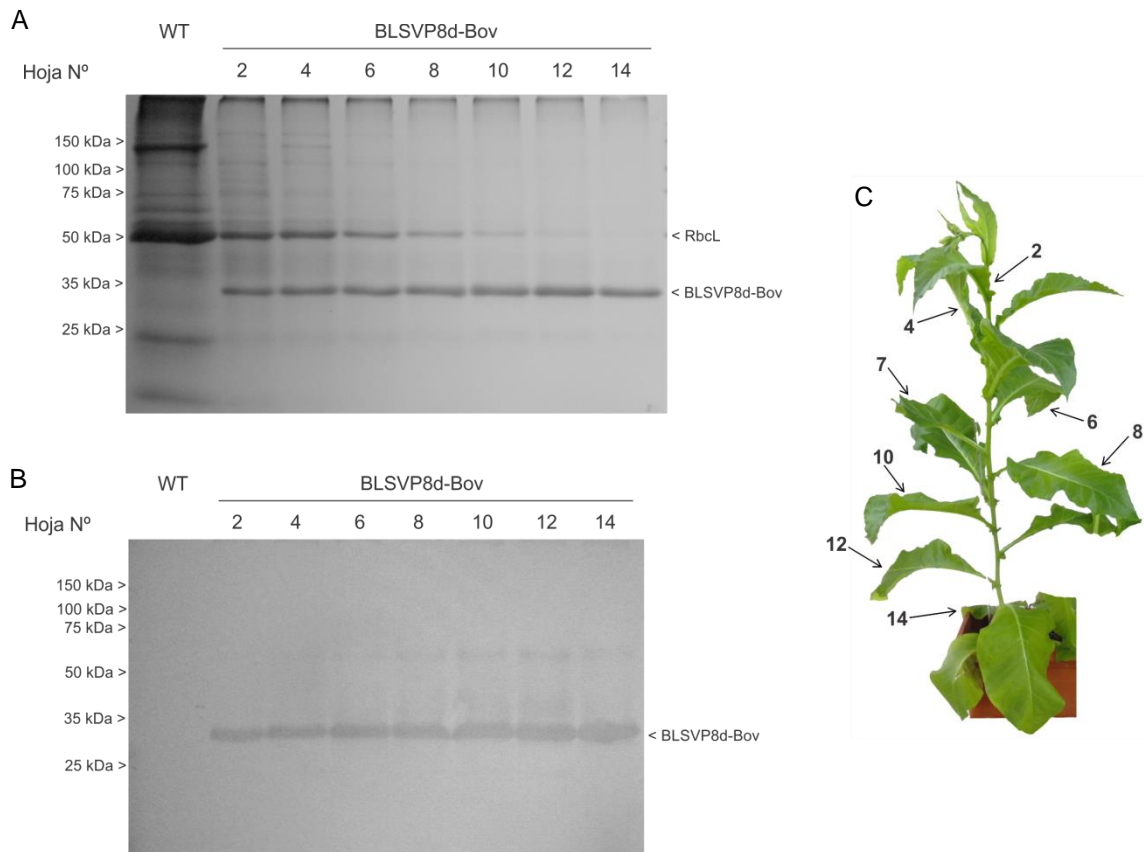


Figura 15. Caracterización de la acumulación de BLSVP8d-Bov a lo largo del desarrollo de una planta transplástica. (A) Gel SDS-PAGE 12,5% teñido con *Coomassie brilliant blue*. **(B)** *Western blot* revelado con anticuerpos dirigidos contra VP8* de rotavirus bovino. Todas las calles contienen extractos proteicos totales derivados de 1 mg de tejido foliar fresco. Se indica la posición de BLSVP8d-Bov y RbcL en el margen. Se utilizó extracto total de hojas *wild-type* (4 mg tejido fresco) como control. **(C)** Planta utilizada en el estudio. Las hojas fueron numeradas de acuerdo a su edad desde el ápice a la base, siendo la número 1 la primera hoja completamente expandida. La hoja 7, de edad intermedia, fue utilizada en los ensayos posteriores para la determinación de niveles de expresión. Se indican en los márgenes las posiciones de BLSVP8d-Bov, la subunidad mayor de RuBisCo (RbcL) y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega).

Determinación del nivel de expresión de BLSVP8d-Bov soluble en hojas frescas de plantas transplásticas

Se utilizó la técnica de Bradford para determinar el contenido proteico total a partir de un extracto soluble de una hoja fresca de edad intermedia (**Figura 15C**). Los niveles de expresión de BLSVP8d-Bov se determinaron por densitometría, mediante SDS-PAGE seguido por tinción con *Coomassie brilliant blue* y comparación contra una curva generada con albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Los niveles observados para BLSVP8d-Bov fueron incluso mayores a los observados para la subunidad mayor de RuBisCo, la cual representa la

proteína más abundante en una hoja sin transformar. Los niveles cuantificados para BLSVP8d-Bov fueron de al menos 40% de Proteína Soluble Total (PST) o 4,85 mg/g Tejido Fresco (TF). Esto representa alrededor de 10 veces más proteína recombinante que en el caso de VP8* (Figura 16) (Lentz et al., 2011).

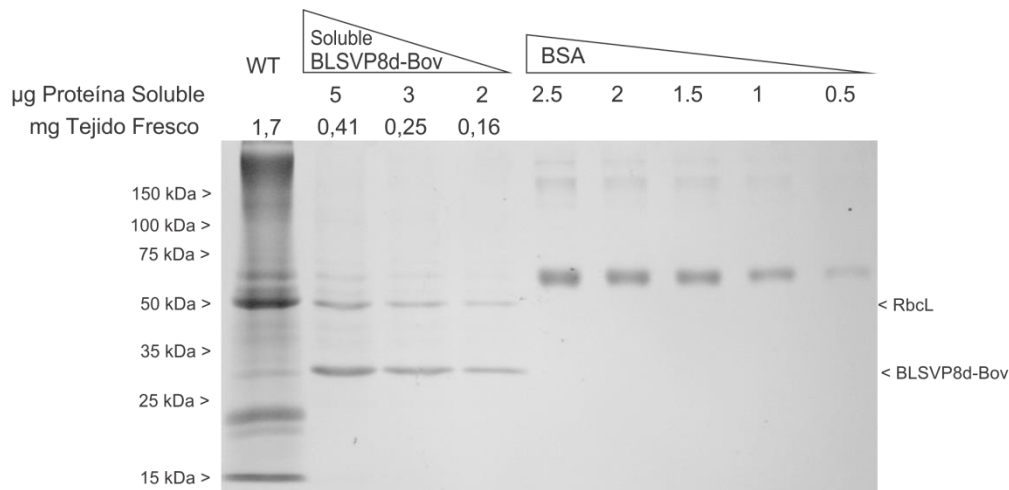


Figura 16. Cuantificación de BLSVP8d-Bov soluble en extractos obtenidos a partir de hoja fresca de edad intermedia. Gel SDS-PAGE 12,5% teñido con *Coomassie brilliant blue* en el que se sembraron diferentes cantidades de proteínas solubles totales de una hoja de edad intermedia de una planta transplastómica. Se cuantificó BLSVP8d-Bov contra una curva de calibración construida con BSA. Se utilizó un extracto total de hojas de una planta *wild-type* como control. Se indica en el margen las posiciones de BLSVP8d-Bov, la subunidad mayor de RuBisCo (RbcL) y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega).

Análisis de la estabilidad de BLSVP8d-Bov Soluble a -70°C

Muestras obtenidas a partir de hoja fresca conteniendo una concentración de BLSVP8d-Bov de aproximadamente 40% de PST fueron congeladas y almacenadas a -70°C en glicerol 5%. La proteína recombinante demostró conservar la estabilidad luego de aproximadamente 20 meses de almacenamiento ininterrumpido en estas condiciones. La cuantificación de estas muestras coincidió con la realizada antes del almacenamiento a largo plazo (Figura 17).

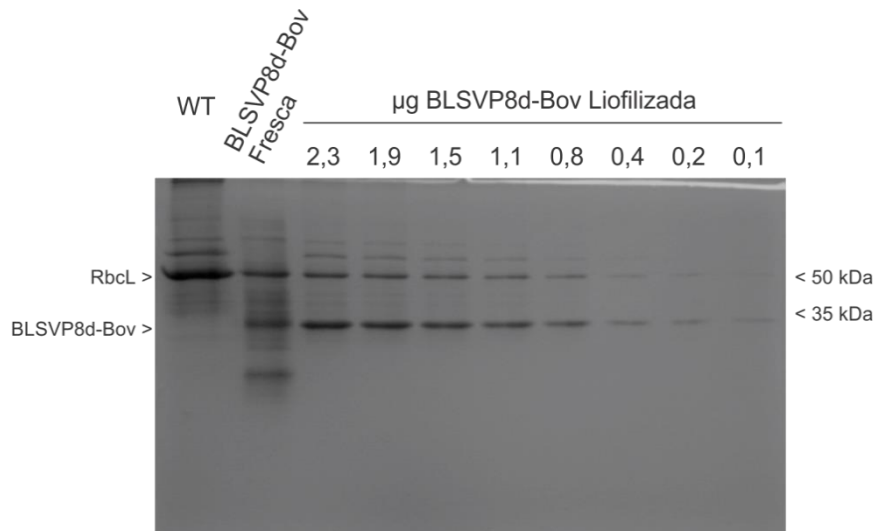


Figura 17. Estabilidad de BLSVP8d-Bov soluble en extractos obtenidos a partir de hojas frescas almacenados a -70°C durante periodos prolongados. Gel SDS-PAGE 15% teñido con *Coomassie brilliant blue* en el que se sembraron diferentes cantidades de BLSVP8d-Bov soluble cuantificada antes del almacenamiento. Se utilizó un extracto total *wild-type* como control. Se indica la posición de BLSVP8d-Bov y la subunidad mayor de RuBisCo (RbcL) en el margen. Como control de estabilidad se incluyó un extracto total conteniendo BLSVP8d-Bov obtenido a partir de 2 mg de tejido fresco. Como control negativo se utilizó un extracto total *wild-type* soluble correspondiente a 3 mg de tejido fresco.

Análisis de la estabilidad y solubilidad de BLSVP8d-Bov en hojas transplastómicas secas

Durante el análisis de acumulación de BLSVP8d-Bov a lo largo del desarrollo de una planta transplastómica pudo detectarse la proteína recombinante en gran cantidad incluso en una hoja senescente y seca. En estos extractos el resto de las proteínas de la planta se hallaba mayoritariamente degradado, dando lugar a un gran incremento en la concentración de BLSVP8d-Bov. Se decidió entonces estudiar el perfil de solubilidad de la proteína recombinante en hojas secadas de manera artificial a temperatura ambiente, empleando un proceso similar al curado industrial del tabaco.

En un ensayo preliminar se analizó la solubilidad de BLSVP8d-Bov en hojas que estaban en pleno proceso de secado en tierra. En estas hojas, en las que el secado era parcial, ya pudo evidenciarse una tendencia de BLSVP8d-Bov a volverse insoluble, agregarse y formar dímeros y otras formas de alto peso molecular. (**Figura 18**).

Al analizar hojas de distintas edades completamente secadas de manera artificial pudo detectarse que BLSVP8d-Bov constituía virtualmente la totalidad de la proteína no degradada

remanente en la hoja. Como resultado del proceso de secado, BLSVP8d-Bov paso de ser soluble a encontrarse mayoritariamente de manera insoluble. Se detectó además que la proteína recombinante se encontraba notablemente agregada, pudiéndose visualizar un dímero de alrededor de 70 kDa y un agregado de proteína de pesos moleculares mayores a 35 kDa (**Figura 19**). Esta agregación se tornó mucho más evidente a tiempos más largos (100 días) de almacenamiento a temperatura ambiente de las plantas ya secadas.

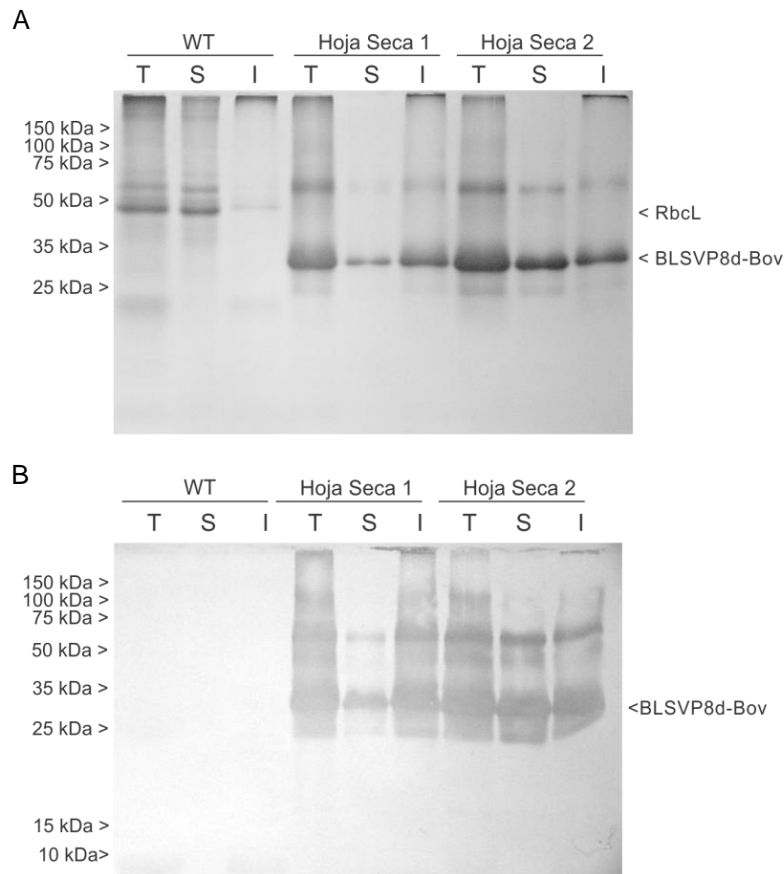


Figura 18. Análisis de la solubilidad y estabilidad de BLSVP8d-Bov en hojas secadas parcialmente de plantas en tierra. (A) Gel SDS-PAGE 12,5% teñido con *Coomassie brilliant blue*. **(B)** *Western blot* revelado con anticuerpos dirigidos contra VP8* de rotavirus bovino. Se incluyeron extractos *wild-type* frescos (cada uno equivalente a 2 mg tejido) como controles. T, S, I: extractos total, soluble e insoluble, respectivamente (0,25 mg tejido seco). Se indican las posiciones de BLSVP8d-Bov, la subunidad mayor de RuBisCo (RbcL) y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega) en los márgenes.

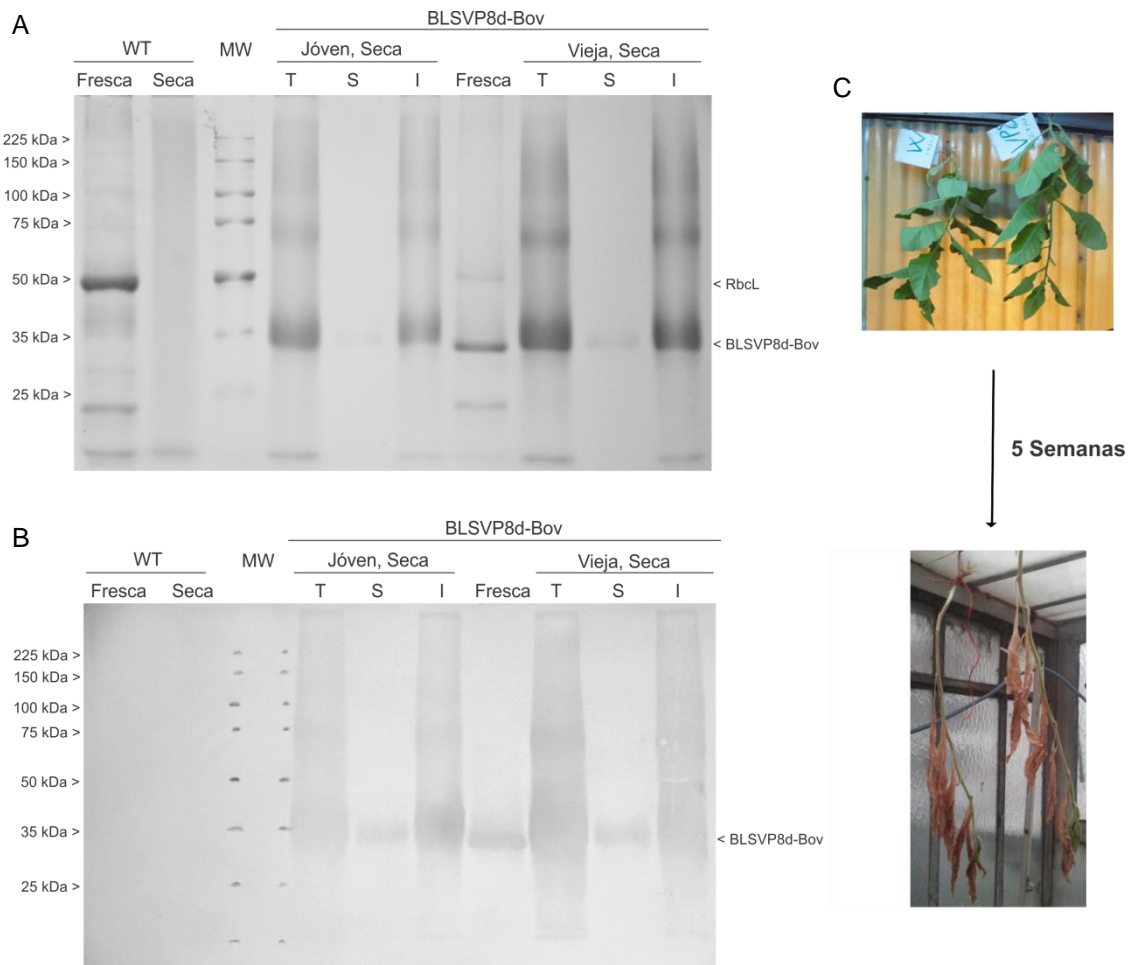


Figura 19. Análisis de la solubilidad y estabilidad de BLSVP8d-Bov en hojas de diferente edad secadas artificialmente. (A) Gel SDS-PAGE 12,5% teñido con *Coomassie brilliant blue*. (B) Western blot revelado con anticuerpos dirigidos contra VP8* de rotavirus bovino. Se incluyeron extractos totales de hojas frescas *wild-type* (2 mg) y hojas secas (0,5 mg) como controles. Como control de integridad se incluyó un extracto de una hoja fresca que expresa BLSVP8d-Bov (1 mg). T, S, I: extractos total, soluble e insoluble, respectivamente (0,25 mg tejido seco). Se indican las posiciones de BLSVP8d-Bov, la subunidad mayor de RuBisCo (RbcL) y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega) en los márgenes. (C) Plantas usadas en los ensayos antes y después de ser secadas artificialmente por 5 semanas. Se analizaron hojas completamente secas: una de mayor edad y otra joven.

Determinación del nivel de expresión de BLSVP8d-Bov insoluble en hojas secadas artificialmente

Se decidió cuantificar BLSVP8d-Bov insoluble a partir de hojas secadas artificialmente para incluir estos extractos en el esquema de inmunización posterior. En hojas completamente secas almacenadas durante 100 días a temperatura ambiente la agregación de la proteína recombinante fue tal que no se pudo cuantificar. En contraste, para BLSVP8d-Bov insoluble

extraída a partir de una hoja madura secada durante 35 días se obtuvo un valor de alrededor de 26 mg/g Tejido Seco (TS). Este valor no tuvo en cuenta la presencia de agregados de proteína recombinante de mayor tamaño (**Figura 20**).

Si bien BLSVP8d-Bov formó agregados insolubles altamente estables, estos dificultaron su procesamiento para ser utilizados en ensayos de inmunización posteriores. Esta muestra de BLSVP8d-Bov cuantificada y obtenida a partir de hoja secada artificialmente no fue capaz de inducir la producción de anticuerpos IgY en yema de huevo al ser administrada de manera intramuscular en gallinas (datos no mostrados).

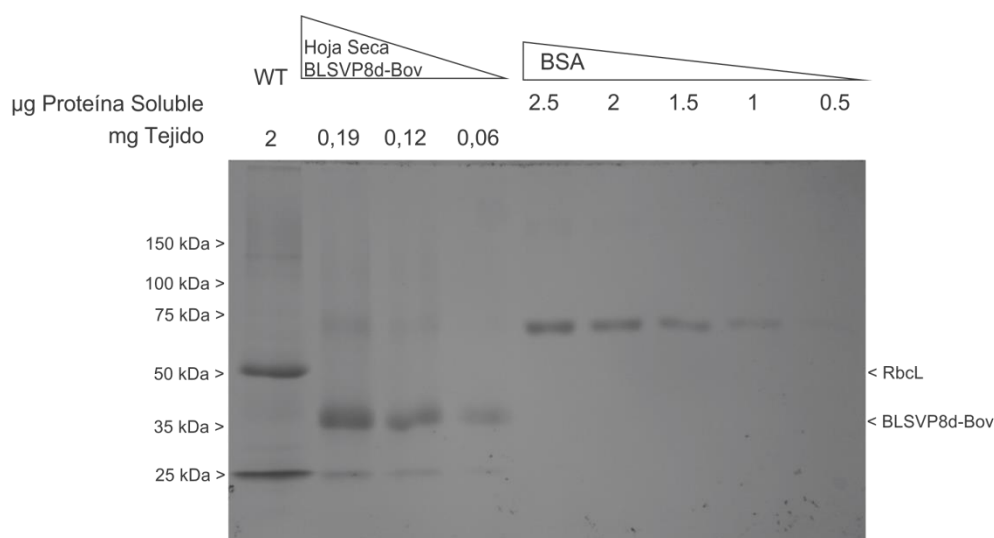


Figura 20. Cuantificación de BLSVP8d-Bov insoluble en extractos obtenidos a partir de hoja secada artificialmente. Gel SDS-PAGE 12,5% teñido con *Coomassie brilliant blue* en el que se sembraron diferentes cantidades de proteína insoluble total. Se cuantificó BLSVP8d-Bov contra una curva de calibración construida con BSA. Se utilizó un extracto total de hojas *wild-type* como control. Se indican las posiciones de BLSVP8d-Bov, la subunidad mayor de RuBisCo (RbcL) y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega) en los márgenes.

Análisis de la estabilidad y solubilidad de BLSVP8d-Bov en hojas transplásticas liofilizadas

Como alternativa al secado a temperatura ambiente, se liofilizaron hojas transplásticas expresando BLSVP8d-Bov y se analizó su solubilidad mediante SDS-PAGE seguida de tinción con *Coomassie brilliant blue*. A diferencia de lo que ocurrió con las hojas secadas de manera artificial, la fusión BLSVP8d-Bov permaneció estable y soluble aun luego del proceso de liofilización y congelado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al comparar estos extractos liofilizados con

extractos equivalentes obtenidos de hojas frescas, las hojas liofilizadas presentaron mayor degradación de las proteínas propias de la planta. Por lo tanto, dado el carácter estable de BLSVP8d-Bov, esta proteína se encontró levemente más concentrada en las hojas liofilizadas (**Figura 21**). Considerando la estabilidad y carácter soluble de BLSVP8d-Bov en las hojas liofilizadas se decidió incluir extractos obtenidos a partir de estas en los ensayos de inmunización subsiguientes.

Durante el análisis de hojas liofilizadas se incluyó además un extracto total obtenido a partir de una hoja de una planta secada artificialmente. La inclusión de este extracto permitió establecer que el proceso de liofilización no trajo aparejada una agregación de BLSVP8d-Bov, tal como ocurrió en las hojas secadas artificialmente. A diferencia de lo acontecido en las hojas liofilizadas, durante este proceso alternativo de secado las proteínas propias de la planta se degradaron en su totalidad y BLSVP8d-Bov constituyó prácticamente el total de las proteínas íntegras remanentes.

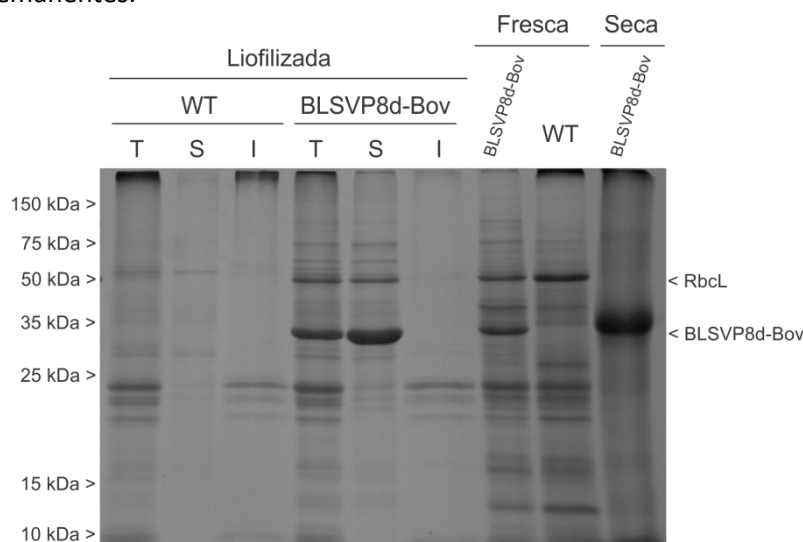


Figura 21. Análisis de la estabilidad y solubilidad de BLSVP8d-Bov en hojas transplastómicas liofilizadas. Gel SDS-PAGE 12,5% teñido con *Coomassie brilliant blue*. Las calles fueron cargadas con extractos obtenidos a partir de 0,25 mg y 3 mg en el caso de tejido liofilizado y tejido fresco, respectivamente. Se utilizaron extractos *wild-type* como controles. T, S, I: extractos total, soluble e insoluble, respectivamente. Se indican las posiciones de BLSVP8d-Bov, la subunidad mayor de RuBisCo (RbcL) y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega) en los márgenes.

Con el objeto de evaluar estrategias alternativas de almacenamiento de los extractos liofilizados se repitió el análisis de solubilidad de BLSVP8d-Bov en hojas liofilizadas mantenidas a temperatura ambiente por un mes en el laboratorio. Una vez más, no se observó alteración de la solubilidad de la proteína recombinante, siendo la movilidad electroforética de la misma

indistinguible de la que presentó en un extracto obtenido a partir de una hoja fresca (**Figura 22**).

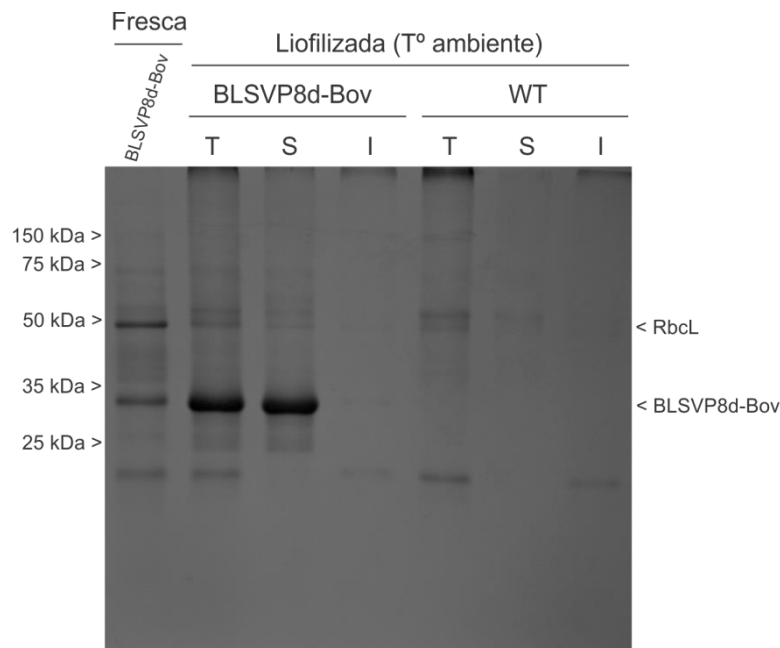


Figura 22. Análisis de la estabilidad y solubilidad de BLSVP8d-Bov en hojas transplastómicas liofilizadas almacenadas por un mes a temperatura ambiente. Gel SDS-PAGE 12,5% teñido con *Coomassie brilliant blue*. Las calles fueron cargadas con extractos obtenidos a partir de 0,25 mg y 2 mg en el caso de tejido liofilizado y tejido fresco, respectivamente. Se utilizaron extractos *wild-type* como controles. T, S, I: extractos total, soluble e insoluble, respectivamente. Se indican las posiciones de BLSVP8d-Bov, la subunidad mayor de RuBisCo (RbcL) y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega) en los márgenes.

Determinación del nivel de expresión de la fracción soluble de BLSVP8d-Bov en hojas liofilizadas de plantas transplastómicas

Al igual que en el caso de las hojas frescas, y dada la solubilidad y estabilidad en hojas liofilizadas, se procedió a cuantificar la fracción soluble de BLSVP8d-Bov luego del proceso de liofilizado. En este caso se eligió una hoja fresca de edad más avanzada y como control se realizó una cuantificación previa al proceso de liofilizado. Esta vez los niveles de expresión superaron ampliamente a los de la subunidad mayor de RuBisCo en ambos tipos de hoja, obteniéndose niveles de alrededor del 75 y 70% de Proteína Soluble Total (PST) para los extractos obtenidos a partir de hoja fresca y liofilizada, respectivamente. Teniendo en cuenta la masa de tejido, los valores obtenidos para BLSVP8d-Bov fueron de 6,31 mg/g Tejido Fresco (TF) y 34,61 mg/g Tejido Liofilizado (TL) (**Figura 23**).

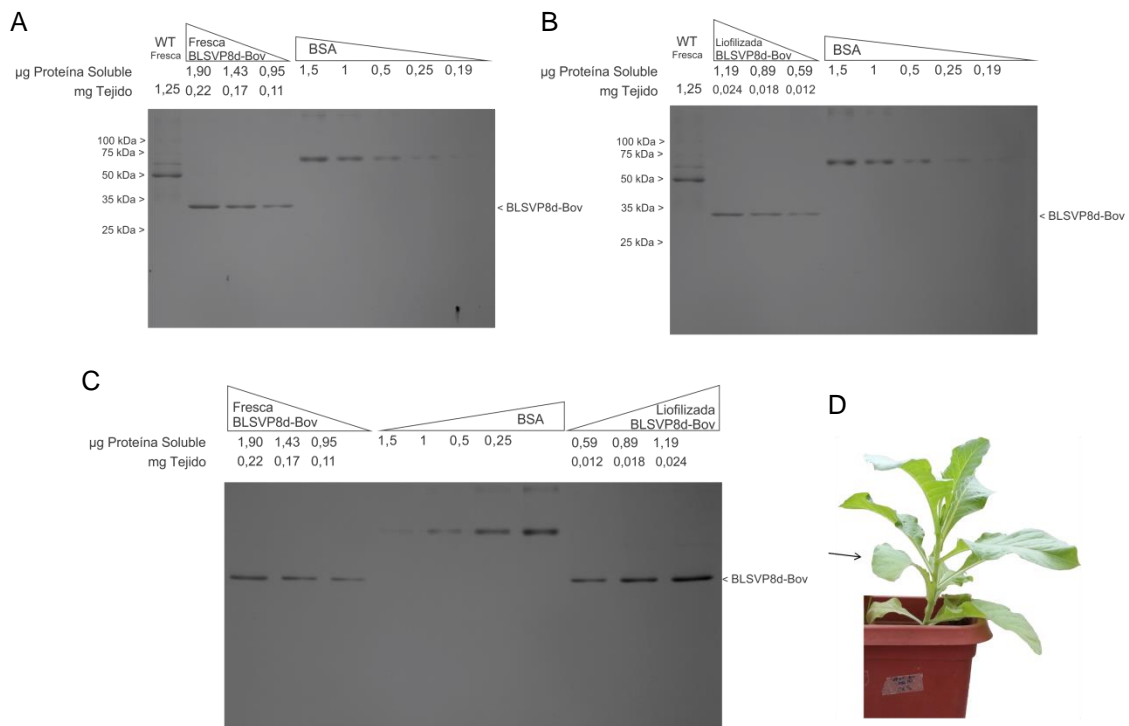


Figura 23. Cuantificación de BLSVP8d-Bov soluble en extractos obtenidos a partir de hoja fresca y liofilizada de edad avanzada. **(A, B y C)** Geles SDS-PAGE 12,5% teñidos con *Coomassie brilliant blue* en los que se sembraron diferentes cantidades de proteína soluble total de una hoja de edad avanzada proveniente de hoja fresca, liofilizada o ambas, respectivamente. Se cuantificó BLSVP8d-Bov utilizando una curva de calibración construida con BSA. Se utilizó un extracto total de hojas *wild-type* como control. Se indican las posiciones de BLSVP8d-Bov y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega) en los márgenes. **(D)** Hoja utilizada en la cuantificación.

Inmunogenicidad de BLSVP8d-Bov obtenida a partir de plantas transplastómicas

La inmunogenicidad de la proteína recombinante producida en las plantas transplastómicas BLSVP8d-Bov se confirmó en un modelo de gallinas ponedoras. Los animales recibieron tres dosis conteniendo 3,83 μ g de BLSVP8d-Bov (de los cuales 2 μ g correspondieron a VP8d) en los días 0, 30 y 75. Luego de transcurrida una semana de la última inmunización se recolectaron los huevos aproximadamente cada 7 días durante 3 semanas (**Figura 24**). Mediante la técnica de ELISA fue posible la detección de anticuerpos IgY en yema de huevo específicos contra BLSVP8d-Bov tanto luego de inocular los animales con extractos solubles provenientes de hojas frescas como luego de realizar la inoculación con extractos solubles obtenidos a partir de hojas liofilizadas. En ningún caso pudieron detectarse anticuerpos específicos luego de inmunizar con los respectivos extractos obtenidos a partir de hojas *wild-*

type. La respuesta fue levemente más rápida en el caso de los extractos obtenidos a partir de hojas frescas. Los títulos de anticuerpos fueron de 12800 en el caso de los extractos obtenidos a partir de hoja fresca y variaron entre 3200 y 12800 para los extractos obtenidos de hojas liofilizadas. (Figura 25).

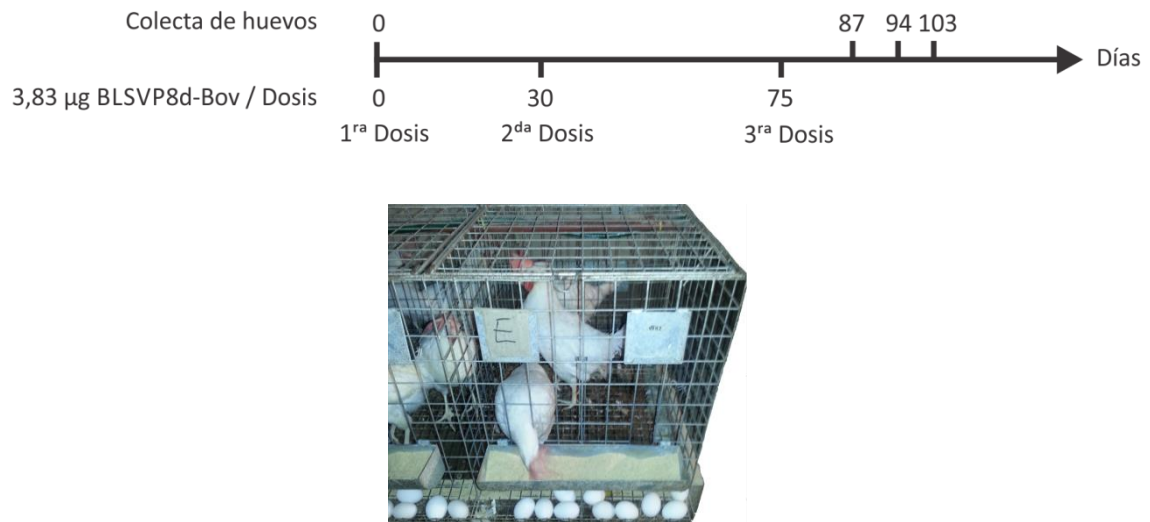


Figura 24. Esquema y modelo de gallina ponedora empleados para los ensayos de inmunización con extractos de proteínas de plantas.

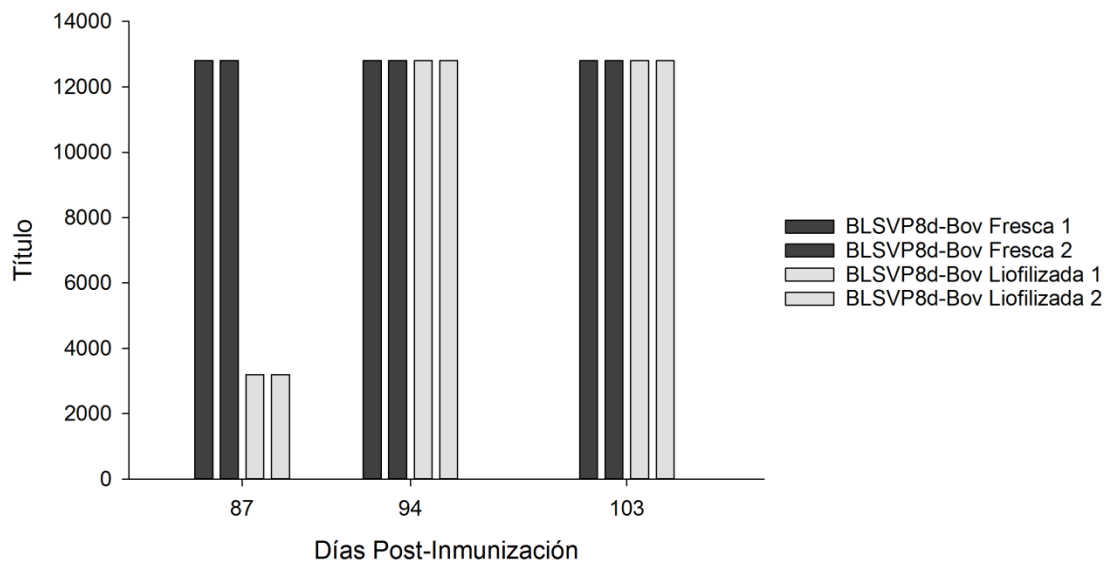


Figura 25. Detección por ELISA de anticuerpos IgY específicos contra BLSVP8d-Bov en yema de huevos. Los huevos fueron obtenidos a partir de gallinas inmunizadas con extractos solubles totales de hojas frescas de plantas transplastómicas (barras oscuras) y de hojas liofilizadas (barras claras). Como control se inmunizaron gallinas con extractos solubles obtenidos a partir de hojas frescas de plantas no transformadas y de hojas liofilizadas. Los títulos fueron expresados como la recíproca de la mayor dilución que presentó un valor de densidad óptica (DO) por encima del valor promedio de DO más 3 desvíos estándar obtenido para la respectiva muestra control.

Ensayo de neutralización viral *in vitro*

La capacidad de los anticuerpos específicos contra BLSVP8d-Bov para inhibir la infección del rotavirus fue evaluada mediante un ensayo de neutralización viral *in vitro*. El ensayo llevado a cabo permitió detectar títulos significativos de anticuerpos neutralizantes tanto en la fracción de IgY obtenida por inmunización con extractos de hojas frescas como en la fracción equivalente proveniente de animales inmunizados con extractos de hojas liofilizadas. En contraste, no se evidenció disminución de la infectividad en ninguno de los controles realizados a partir de extractos de hojas frescas o liofilizadas provenientes de plantas sin transformar (**Figura 26**).

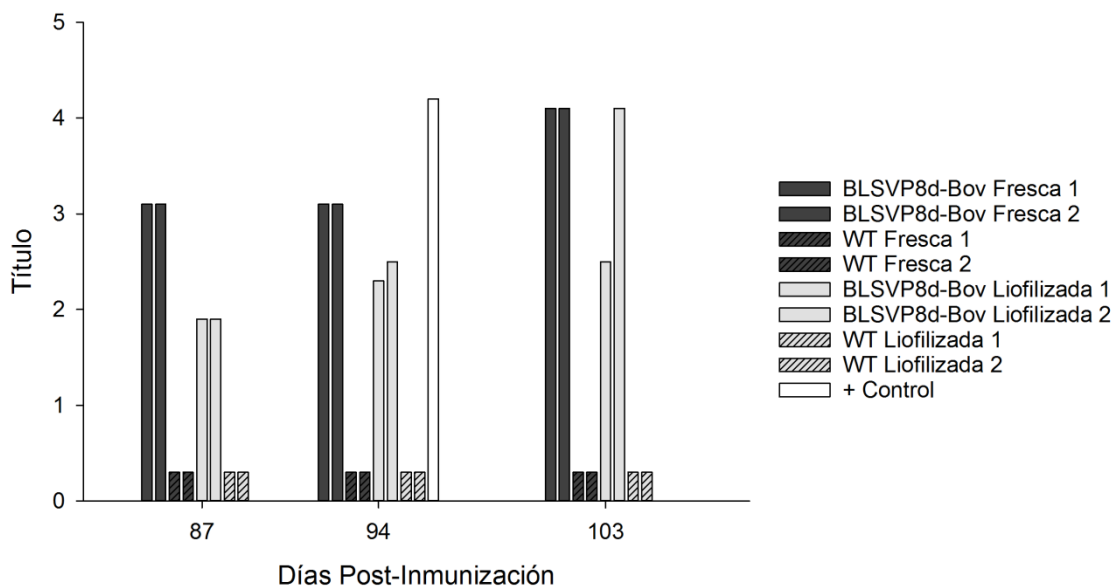


Figura 26. Ensayo de neutralización viral *in vitro* para evaluar la protección conferida por los anticuerpos IgY específicos frente a la infección con BRV C486. Se indican los títulos, calculados a partir de ensayos por cuadruplicado, correspondientes a muestras de IgY obtenidas luego de diferentes tiempos a partir de la inmunización con extractos de hojas transplastómicas y WT frescas (barras oscuras lisas y rayadas, respectivamente) y liofilizadas (barras claras lisas y rayadas, respectivamente). Se incluyó como control una muestra de IgY obtenida previamente a partir de una gallina inmunizada con 3,83 µg de BLSVP8d-Bov producida en *E. coli*. Los títulos fueron calculados por el método de Reed & Muench considerando la mayor dilución que permitió una reducción de focos fluorescentes de al menos un 80%.

PARTE II: Expresión en cloroplastos de tabaco de los antígenos VP8d de Rotavirus Equino solo y fusionado a la enzima lumazina sintasa de *Brucella Spp.*

Introducción

De manera similar que en el caso de los terneros recién nacidos, rotavirus es la principal causa de diarrea en potrillos de hasta 3 meses de edad, causando importantes pérdidas económicas debido a la morbilidad y mortalidad de los animales infectados (Saif et al., 1994).

Tal como sucede en el caso de rotavirus bovino, la proteína estructural VP4 (**Figura 4**) de rotavirus equino (ERV) es una de las principales inductoras de anticuerpos neutralizantes. De manera análoga, la proteína VP8* (**Figura 4**) de rotavirus equino, es una proteína no glicosilada que surge del clivaje por tripsina de la proteína VP4. VP8* de rotavirus equino resulta un candidato atractivo para inmunización dado que también en este caso es un determinante importante de infectividad viral y es un antígeno capaz de dar lugar a la producción de anticuerpos con actividad neutralizante.

En base a las características de las proteínas VP7 y VP4 de la capa externa de la cápside viral los rotavirus se clasifican según su serotipo en G-tipos y P-tipos, respectivamente (Matthijnssens et al., 2008). La nomenclatura alude a que VP7 es una glicoproteína (G-tipo) mientras que VP4 es sensible a proteasa (P-tipo) (Daniell et al., 2002). En el caso de rotavirus equino el tipo G3 es el más predominante a nivel mundial. Lo mismo ocurre en Argentina, tal como se desprende de un análisis realizado durante 17 años, desde el año 1992 hasta el 2008. En el país, independientemente del G-tipo, prácticamente la totalidad de los serotipos de rotavirus analizados corresponden al tipo P12 (Garaicoechea et al., 2011).

Existe una vacuna (Rota Coli Equina, Instituto San Jorge Bagó) desarrollada en Argentina y comercializada desde el año 1996 compuesta por rotavirus inactivados equino H2 (G3P[12]), de simio SA11 (G3P[2]) y bovino NCDV-Lincoln (G6P[1]) formulada en adyuvante acuoso (Barrandeguy et al., 1998). Inicialmente denominada Rota Coli Equina (Instituto San Jorge Bagó) hoy día esta vacuna es comercializada por la firma Biochemiq bajo el nombre Rotamix Equin. La misma es administrada a las hembras preñadas durante el último tercio de la gestación y luego se suministra el calostro de la madre vacunada al potrillo recién nacido. Durante varios años esta vacuna fue capaz de reducir la incidencia de diarrea ocasionada por rotavirus. Recientemente, dada la constante presión de selección ejercida por la vacunación sistemática, hay una prevalencia más importante del tipo G14P[12], observándose una

morbidez considerablemente mayor de los animales (ya que el genotipo G14 no resulta protegido por la vacuna) (Garaicoechea et al., 2011).

Considerando la elevada conservación del tipo P12 en el país, el desarrollo de una vacuna recombinante a subunidad basada en VP8d se perfila como una estrategia excelente para prevenir brotes de la enfermedad. Este tipo de vacuna resulta atractiva y conveniente ya que en la Argentina no están permitidas las vacunas compuestas por cepas atenuadas para equinos (dado su potencial de reversión para volver a ser infectivas). Por otra parte, una vacuna compuesta por rotavirus inactivado no resulta práctica ya que su aplicación interfiere con los análisis serológicos posteriores que se emplean de rutina para vigilar la aparición de la enfermedad, pudiendo dar lugar a falsos positivos. En contraste, una vacuna recombinante a subunidad permite diferenciar animales infectados de vacunados a partir de ensayos de diagnóstico basados en la generación diferencial de anticuerpos inducidos por la vacuna o el virus *wild-type* (Ruiz et al., 2015).

En experimentos anteriores del grupo se ha intentado expresar el antígeno VP8d de rotavirus equino fusionado a BLS en *E. coli*, quedando en evidencia la elevada inestabilidad y la degradación del mismo en este sistema. Dados los resultados alentadores obtenidos en la primer parte de la presente tesis con el antígeno VP8d de rotavirus bovino fusionado a la enzima inmunogénica lumazina sintasa de *Brucella* spp (BLS), se decidió expresar otra fusión a BLS en plantas empleando esta vez la proteína VP8d proveniente de RVE (**Figura 27**).

Teniendo en cuenta que en Argentina existen 3 serotipos predominantes de rotavirus bovino, que las plantas transplastómicas BLSVP8d-Bov confieren inmunidad contra un solo serotipo y que en Argentina predomina un único serotipo de rotavirus equino (cepa H2 G3P[12]), resulta más factible el desarrollo de una versión comercializable de antígenos vacunales obtenidos a partir de plantas transplastómicas y orientados a equinos.

A modo de determinar con mayor precisión la influencia de la BLS sobre la inmunogenicidad, la estabilidad y los niveles de expresión en el estroma de los cloroplastos de las proteínas fusionadas a ella, decidimos expresar y caracterizar en paralelo el antígeno VP8d proveniente de rotavirus equino fusionado a BLS y sin fusionar.

Bovina 1	MHEPVLDPYQPTTFNPPVSYWMLLAPTNAGVVDQGTNNTNRWLATILIKPNVQQVERTYTL	62
	M EPVLDGPYQPT FNPPV+YWMLL+P NAGVV +GTN+ +RWLATILI+PNV RTYTL	
Equina 1	M-EPVLDGPYQPTKFNPPVNYWMLLSPLNAGVVVEGTNSIDRWLATILIEPNVTTTTTRTYTL	61
Bovina 63	FGQQVQVTVSNDSTKWKFDLSKQTQDGNYSQHGPLLSTPKLYGVMKHGGKIYTYNGET	122
	FG Q Q++V N+S TKWKF++L K T G++S + LLS PKL+G+MKHGG+++ YNGET	
Equina 62	FGVQEQISVENNSTTKWKFINLIKTTLSGSFSLYSTLLSEPKLHGIMKHGGQLWVYNGET	121
Bovina 123	PNATTGYSTTNFDTVNMAYCDFYIIPLAQEAKCTEYINNGL	165
	PNATT Y T+N+D + MT++CDFYIIP QE+ CTEYINNGL	
Equina 122	PNATTTGYVTSNYDALMTSFCDFYIIPRNQESTCTEYINNGL	164

Figura 27. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de VP8d de Rotavirus Bovino (RVB) cepa C486 y Rotavirus Equino (RVE) cepa H2. Se señalan los residuos idénticos (66%) y similares (+). Considerando residuos similares la similitud es del 81%.

Resultados Parte II

Subclonado de la secuencias VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en el vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr

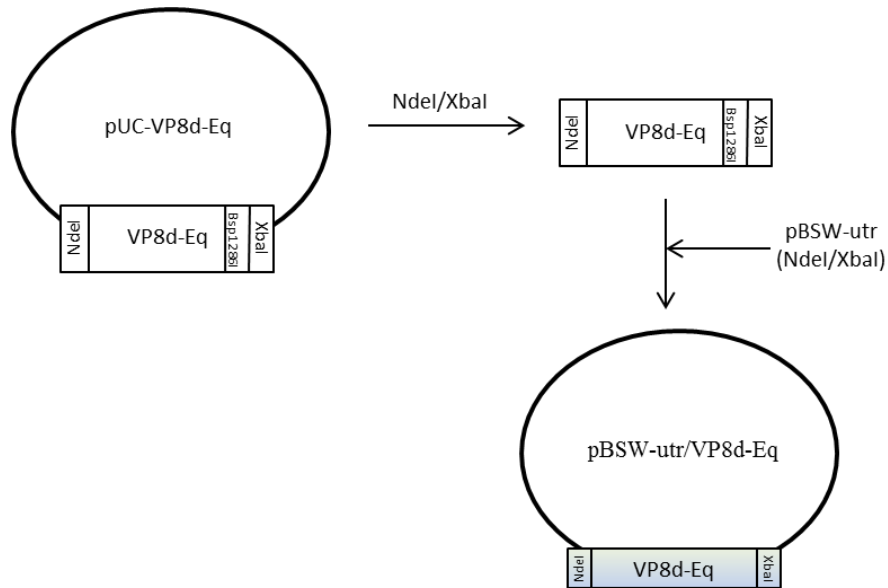


Figura 28. Estrategia de clonado empleada para obtener el vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr/VP8d-Eq. Se detallan de manera gráfica las diferentes etapas del clonado.

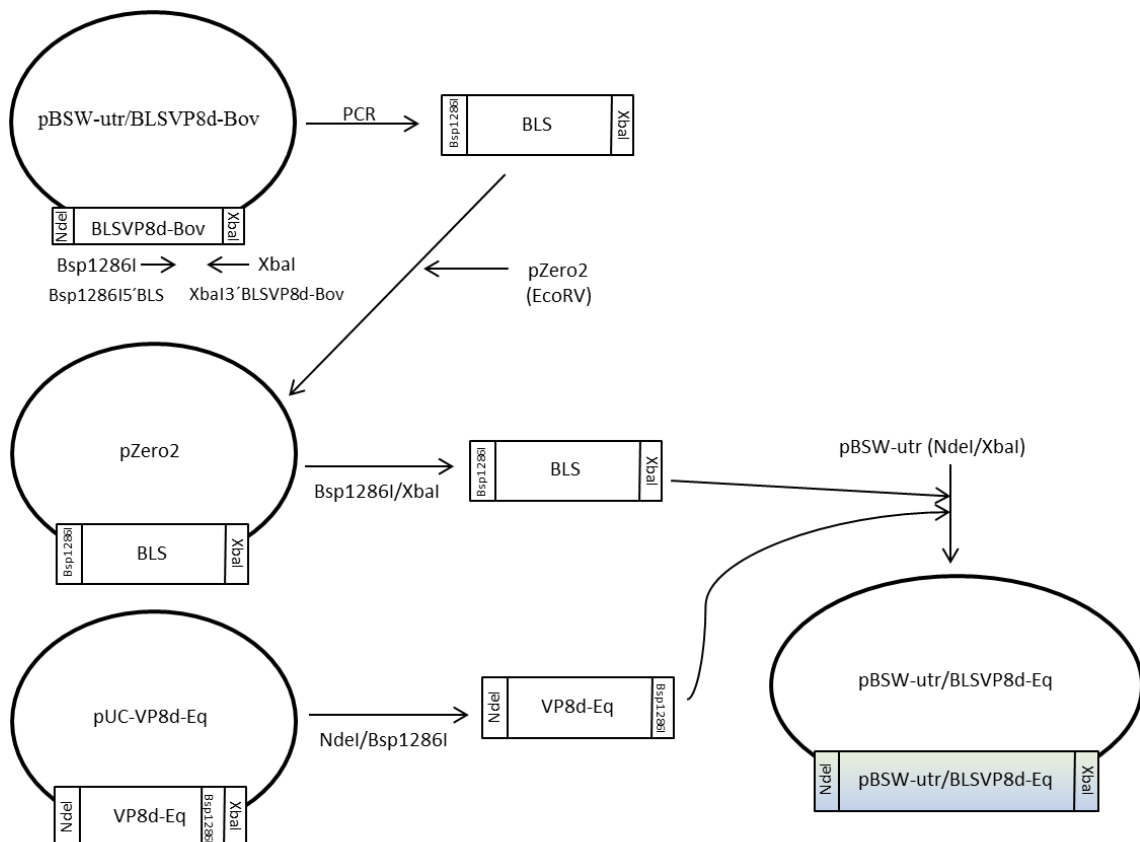


Figura 29. Estrategia de clonado empleada para obtener el vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr/BLSVP8d-Eq. Se detallan de manera gráfica las diferentes etapas del clonado.

La secuencia correspondiente al antígeno VP8d de Rotavirus equino (VP8d-Eq, que codifica desde el aminoácido 62 al 224 de la proteína VP4) se obtuvo por síntesis de ADN. El diseño se hizo de manera de incorporar sitios de restricción NdeI y XbaI flanqueantes a la secuencia codificante para facilitar el posterior clonado en el vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr. La secuencia VP8d-Eq se modificó levemente, siempre generando cambios sinónimos de codones, de manera de eliminar un sitio de restricción XbaI interno y de generar un sitio Bsp1286I inmediatamente antes del codón de terminación. El vector pUC-VP8d-Eq conteniendo la secuencia sintetizada fue digerido con NdeI y XbaI y el fragmento correspondiente a VP8d-Eq fue purificado y finalmente ligado al vector pBSW-utr. Este último fue obtenido cortando el vector pBSW-utr/hEGF (Wirth et al., 2006) con las enzimas NdeI y XbaI de manera de remover la secuencia de hEGF. El vector resultante fue denominado pBSW-utr/VP8d-Eq (**Figura 28**). Previo a la transformación de cloroplastos de tabaco se verificó la integridad de la construcción obtenida mediante mapeo de restricción y secuenciación.

En el caso de BLSVP8d-Eq, el plásmido conteniendo el gen VP8d-Eq sintético se digirió empleando las enzimas NdeI y Bsp1286I. De manera de poder fusionar el fragmento resultante al de BLS se realizó una amplificación por PCR empleando la enzima Pfu, los oligonucleótidos Bsp1286I5´BLS (que introdujo un sitio Bsp1286I) y XbaI3´BLSVP8d-Bov (que introdujo un sitio XbaI luego del codón de terminación) y el plásmido pBSW-utr/BLSVP8d-Bov como molde. El producto de amplificación comprendió al *linker* pentapeptídico seguido por la secuencia de BLS. El producto de PCR de extremos romos fue clonado en el vector pZErO-2 (Invitrogen) previamente digerido con la enzima de restricción EcoRV. Posteriormente, este vector intermediario fue digerido con las enzimas Bsp1286I y XbaI de manera de poder liberar el fragmento que contiene la secuencia completa de BLS. En este vector la secuencia reconocida por XbaI inmediatamente después del codón de terminación se hallaba metilada, por lo cual la enzima realizó un corte 40 nucleótidos río abajo en una secuencia interna del vector, no viéndose afectada la integridad de la secuencia codificante. Los fragmentos correspondientes a VP8d-Eq y BLS fueron ligados en simultáneo con el vector pBSW-utr. Este último fue obtenido cortando el vector pBSW-utr/hEGF (Wirth et al., 2006) con las enzimas NdeI y XbaI de manera de remover la secuencia de hEGF. El vector resultante fue denominado pBSW-utr/BLSVP8d-Eq (**Figura 29**). Previo a la transformación de cloroplastos de tabaco se determinó la integridad de la construcción obtenida mediante mapeo de restricción y secuenciación para descartar posibles mutaciones introducidas durante la amplificación por PCR.

Previo a la transformación de cloroplastos se realizó un ensayo preliminar de expresión en *E. coli* transformadas con los vectores pBSW-utr/VP8d-Eq y pBSW-utr/BLSVP8d-Eq. La expresión se verificó mediante la técnica de *western blot*. Con este fin se obtuvieron extractos proteicos totales de las bacterias recombinantes que fueron resueltos en un gel SDS-PAGE, transferidos y revelados utilizando anticuerpos de ratón contra VP8* de rotavirus bovino, los cuales cruzan parcialmente con la proteína VP8d-Eq dada su alta similitud de secuencia. De esta manera pudo confirmarse la correcta construcción de los vectores y la expresión de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq. En ninguno de los dos casos pudo detectarse la proteína recombinante mediante tinción con *Coomassie brilliant blue*. En el caso de los *western blots*, VP8d-Eq pudo detectarse correctamente y solo pudo detectarse una fracción minoritaria con el tamaño esperado para BLSVP8d-Eq. La mayoría de las proteínas reveladas mostraron un tamaño menor que se correspondió con productos de degradación en el citoplasma bacteriano (**Figura 30**).

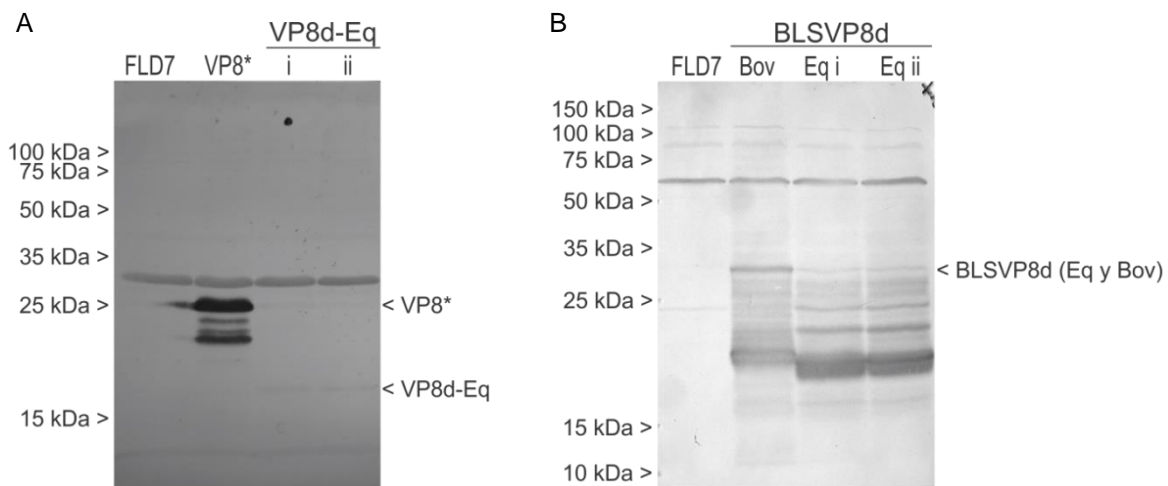


Figura 30. Análisis de la integridad y expresión de los vectores pBSW-utr/VP8d-Eq y pBSW-utr/BLSVP8d-Eq en *E. coli*. (A) *Western blot* revelado anticuerpos contra VP8* de rotavirus bovino, los cuales cruzan parcialmente con VP8d-Eq, para detectar la expresión de VP8d-Eq. (B) *Western blot* revelado con anticuerpos contra BLS para detectar la expresión de BLSVP8d-Eq. Se incluyeron extractos obtenidos a partir de bacterias transformadas con la construcción pBSW-utr/VP8* como control positivo y pBSW-utr/FLD, que expresa una proteína no relacionada, como control negativo. Se indican en los márgenes las posiciones de VP8*, VP8d-Eq, BLSVP8d-Eq y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega).

Transformación de cloroplastos de tabaco con los vectores pBSW-utr/VP8d-Eq y pBSW-utr-BLSVP8d-Eq

La obtención de las líneas transplastómicas se realizó mediante la técnica de biobalística empleando las construcciones pBSW-utr/VP8d-Eq y pBSW-utr/BLSVP8d-Eq. Los explantos regeneraron en medio RMOP en presencia de espectinomicina como agente selector. Los brotes resistentes que se obtuvieron fueron chequeados por PCR empleando los oligonucleótidos Cloro fw y Cloro rev. Sólo en las plantas en las que se produjo la integración de las secuencias recombinantes se obtuvo un producto de amplificación de 1450 pb (**Figura 31A y B**). Se seleccionaron al menos 3 eventos de transformación independientes para cada construcción, los cuales fueron sometidos posteriormente a una caracterización más exhaustiva y posteriormente empleadas en los ensayos de inmunización.

Fragmentos de hojas de las líneas obtenidas fueron sometidos a dos rondas adicionales de regeneración en presencia del agente selector para garantizar la homoplasia. Los brotes resultantes fueron finalmente rusticados y se desarrollaron con normalidad, no pudiendo distinguirse fenotípicamente de plantas no transformadas (**Figura 32**).

La transmisión del transgén se confirmó germinando las semillas obtenidas a partir de las plantas transplastómicas en presencia de espectinomicina. (**Figura 32**).

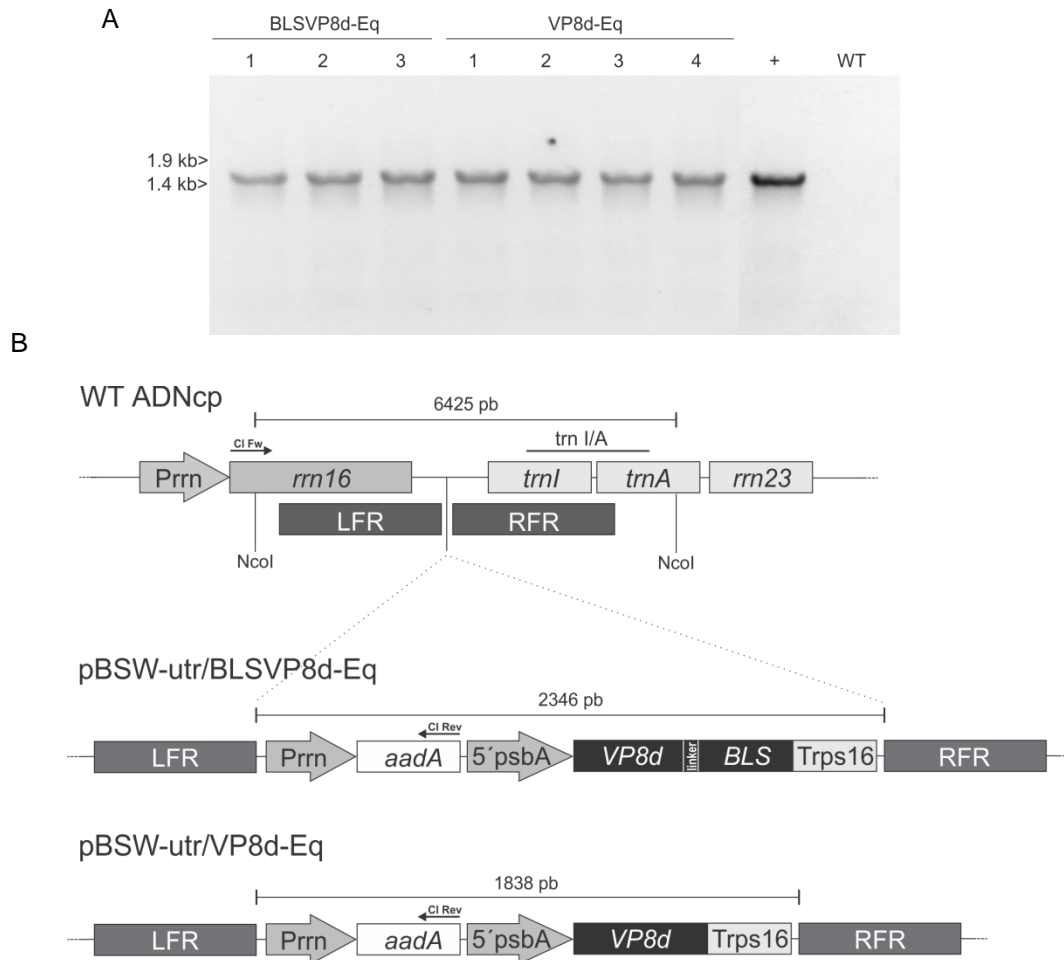


Figura 31. Identificación de las líneas transplastómicas mediante PCR. (A) Análisis utilizando los oligonucleótidos iniciadores *Cloro Fw* y *Rev* para confirmar la correcta integración de los transgenes. 1-4: líneas independientes. +: control positivo. WT: *wild-type*, control negativo. Se incluye en los márgenes la posición del marcador de peso molecular (λ DNA-BstEII Digest, New England Biolabs). **(B)** Esquema que muestra la zona de inserción por recombinación en el genoma plastídico. Se indican los oligonucleótidos empleados en la PCR, los cuales permiten la amplificación de un fragmento de 1450 pb solo en las plantas transplastómicas. El vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr/BLSVP8d-Eq contiene la secuencia de VP8d-Eq fusionada mediante un *linker* a la secuencia de lumazina sintasa. LFR y RFR: flancos izquierdo y derecho de recombinación, respectivamente. *5'psbA*: secuencia no traducible y promotor fuerte del gen *psbA*. *trnI/A* y *NcoI*: sonda y sitios de restricción usados en los ensayos de *Southern blot*, respectivamente.

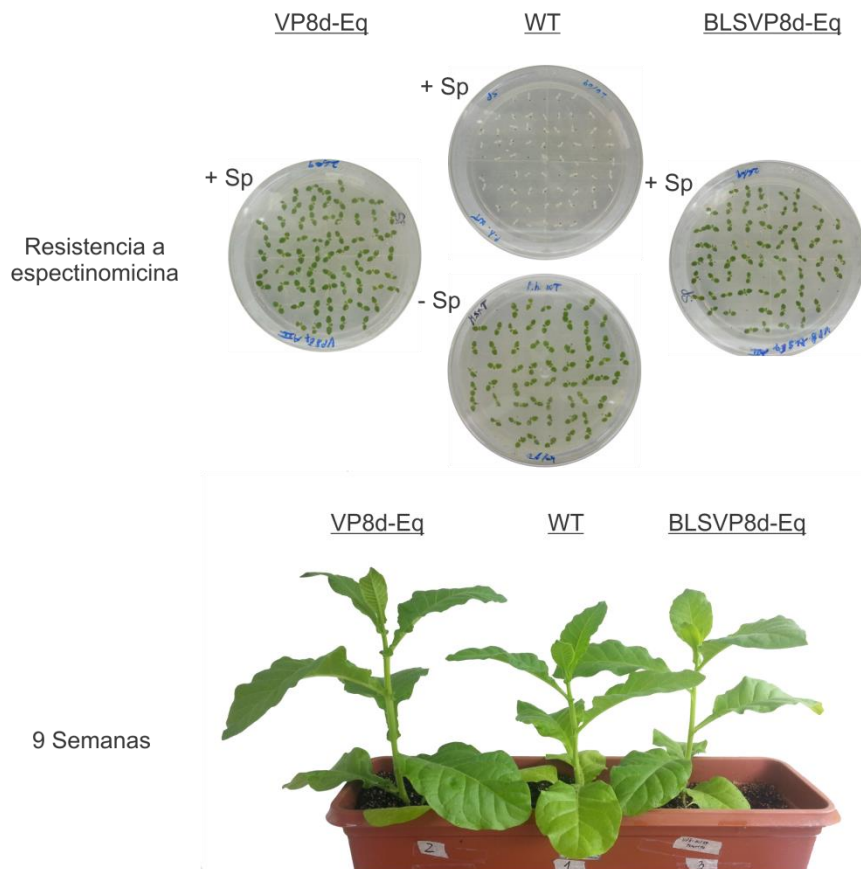


Figura 32. Caracterización fenotípica de las plantas transplastómicas. Germinación a los 12 días post-siembra en presencia o ausencia del agente selector espectinomicina. Luego de germinadas, las plantas crecieron en el invernadero y se registró el fenotipo a las 9 semanas post-siembra.

Análisis de la integración del transgén y estado homoplástico

La inserción, estabilidad y homoplasia de los transgenes en el genoma plastídico de las plantas germinadas en presencia de espectinomicina se realizó mediante *Southern blot* usando una sonda dirigida contra la región *trnI/A*. De esta manera pudo confirmarse la correcta integración por recombinación homóloga en todas las líneas analizadas. En todas las muestras provenientes de plantas transplastómicas pudo observarse una banda residual de tamaño similar a la del control *wild-type*, la cual podría deberse a una fracción minoritaria de cloroplastos no transformados o a la presencia de fragmentos de ADN plastídico en el genoma nuclear (**Figura 33A**).

Análisis de los transcriptos

El nivel de los ARN mensajeros conteniendo la secuencia codificante para BLSVP8d-Eq o VP8d-Eq se analizó mediante la técnica de *northern blot* empleando una sonda contra *VP8d-Eq*. Para ambas proteínas se detectaron 2 tipos de transcriptos principales que presentaron tamaños similares a los esperados: un transcrito más abundante correspondiente al monocistrón generado a partir del promotor fuerte *psbA* y otro transcrito bicistrónico. El monocistrón se detectó con mayor intensidad en el caso de BLSVP8d-Eq. Por otro lado, no pudo detectarse en ningún caso el transcrito policistrónico predicho de mayor tamaño. En el caso de la última muestra correspondiente a VP8d-Eq solo se detectó el monocistrón más abundante debido a un problema con la cantidad de muestra sembrada en el gel, tal como se evidenció a partir del control de carga (**Figura 33C**).

Los tamaños esperados para los transcriptos fueron de alrededor de: 1,2 y 0,7 para el monocistrón; 2,2 y 1,7 para el bicistrón; 3,8 y 3,3 para el policistrón para BLSVP8d-Eq y VP8d-Eq, respectivamente (**Figura 33B**).

La comparación entre los transcriptos detectados, en el mismo ensayo y con diferentes sondas, para BLSVP8-Bov (**Figura 11C**) y BLSVP8d-Eq (**Figura 33C**) permitió confirmar la ausencia del policistrón para esta última muestra. El tamaño de los otros dos transcriptos fue equivalente entre ambos tipos de muestra.

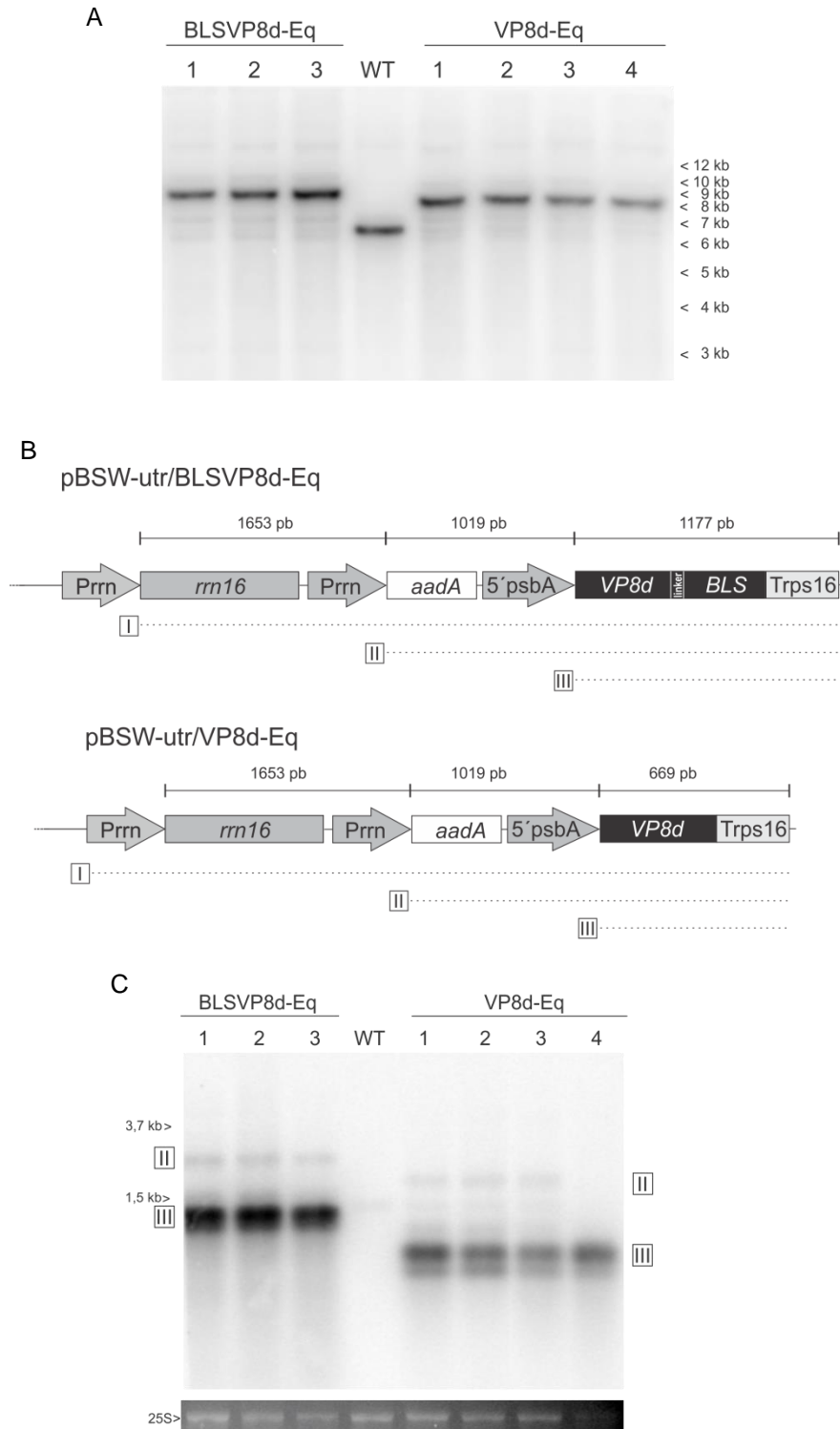


Figura 33. Caracterización molecular de las plantas transplastómicas expresando VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq. (A) *Southern blot* revelado con una sonda contra *trnI/A* para confirmar la inserción y homoplasia. Se indica en el margen la posición del marcador de peso molecular (1 KB, Invitrogen). (B) Mapa físico mostrando los tamaños esperados para los distintos transcritos. I: policistrón (3,8 o 3,3 kpb), II: dicistrón (2,2 o 1,7 Kpb), III: monocistrón (1,2 o 0,7 Kpb). (C) *Northern blot* revelado con una sonda dirigida contra *VP8d-Eq* mostrando los transcritos detectados. Se muestra la banda de ARN ribosomal 25S del gel antes de ser transferido como control de carga. 1, 2, 3 y 4: líneas independientes. WT: *wild-type*.

Expresión de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en plantas transplastómicas

La detección de las proteínas VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en las diferentes líneas transplastómicas se realizó por la técnica de *western blot* a partir de extractos totales de proteínas de hojas usando anticuerpos contra VP8* de rotavirus bovino. Pudieron evidenciarse bandas diferenciales de aproximadamente 35 kDa y 19 kDa (según se tratara de BLSVP8d-Eq o VP8d-Eq, respectivamente) compatibles con los tamaños esperados. Estas bandas estaban ausentes en el extracto obtenido a partir de hojas de una planta sin transformar. Se incluyó como control positivo extracto de hojas de una planta transplastómica expresando VP8*. A diferencia de lo observado en las bacterias, en el estroma del cloroplasto BLSVP8d-Eq presentó el tamaño esperado y no se evidenciaron signos de proteólisis (**Figura 34**).

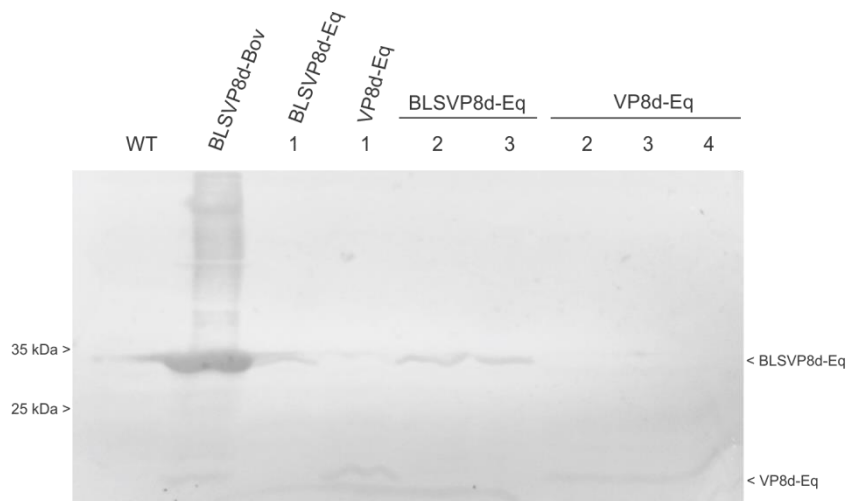


Figura 34. Expresión de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en las diferentes líneas transplastómicas. *Western blot* revelado con anticuerpos contra VP8* de rotavirus bovino, los cuales cruzan parcialmente con VP8d-Eq, mostrando expresión de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en varias líneas independientes para cada construcción. Se incluyeron como controles positivo y negativo extractos provenientes de hojas de una planta que expresa VP8* y de una planta sin transformar, respectivamente. Todas las calles se sembraron con extractos proteicos provenientes de 2 mg de tejido fresco. 1-4: líneas independientes. Se indica en los márgenes las posiciones de BLSVP8d-Eq, VP8d-Eq y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega). WT: *wild-type*.

Adicionalmente, para corroborar la identidad de las proteínas recombinantes, se obtuvieron extractos totales de proteínas de las mismas líneas transplastómicas analizadas previamente y se realizó la detección de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq con una mezcla de anticuerpos obtenidos a partir de una vacuna comercial contra rotavirus equino. Dado que esta vacuna

está compuesta por una mezcla de rotavirus enteros inactivados de equino H2 (G3P[12]), de simio SA11 (G3P[2]) y bovino NCDV-Lincoln (G6P[1]), los anticuerpos fueron capaces de reconocer no solo VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq (ya que ambas proteínas derivan de la cepa H2 y son P[12]), sino también BLSVP8d-Bov (ya que al igual que la cepa NCDV-Lincoln C486 es P[1]). Una vez más, los tamaños fueron los esperados y se observaron bandas diferenciales, las cuales estuvieron ausentes en el extracto correspondiente a una planta no transformada. El revelado permitió evidenciar otras bandas no específicas presentes en el todas las muestras. Tampoco en este caso pudo observarse proteólisis significativa. En el caso de las fusiones a BLS se observó una banda tenue que podría corresponder a una fracción minoritaria de VP8d sin su compañero de fusión (**Figura 35**). A partir de este ensayo, se decidió continuar empleando anticuerpos contra VP8* de rotavirus equino en los análisis subsiguientes de las plantas transplastómicas.

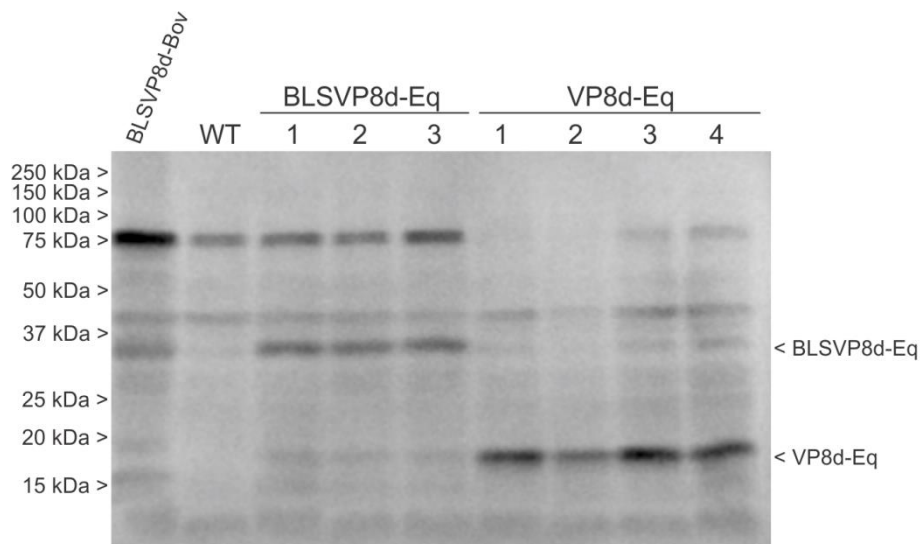


Figura 35. Expresión de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en las diferentes líneas transplastómicas. *Western blot* revelado con una mezcla de anticuerpos contra rotavirus equino, bovino y de simio mostrando expresión de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en varias líneas independientes para cada construcción. Se incluyeron como controles positivo y negativo extractos provenientes de hojas de una planta que expresa BLSVP8d-Bov y de una planta sin transformar, respectivamente. Todas las calles se sembraron con extractos proteicos provenientes de 4 mg de tejido fresco. 1-4: líneas independientes. Se indica en los márgenes las posiciones de BLSVP8d-Eq, VP8d-Eq y el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards, Bio-Rad). WT: *wild-type*.

Análisis de la solubilidad de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en extractos de hojas de plantas

Se analizó la solubilidad de las proteínas recombinantes en extractos de hojas frescas de tabaco. Tanto VP8d-Eq como BLSVP8d-Eq se encontraron de manera estable y predominantemente soluble en el estroma del cloroplasto (**Figura 36**).

Este comportamiento se mantuvo aun luego de liofilizar las hojas. En ambos casos pudieron evidenciarse las bandas correspondientes a VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq tanto por tinción por *Coomassie brilliant blue* como por *western blot*. En el caso de la liofilización, este proceso produjo una disminución del contenido proteico propio de las hojas y trajo asociado, en consecuencia, un aumento en la concentración de las proteínas recombinantes, dada la estabilidad de BLSVP8d-Eq y VP8d-Eq. Es por esto que en los extractos de hojas liofilizadas fue más fácil evidenciar las bandas diferenciales por tinción con *Coomassie brilliant blue* (**Figura 37**).

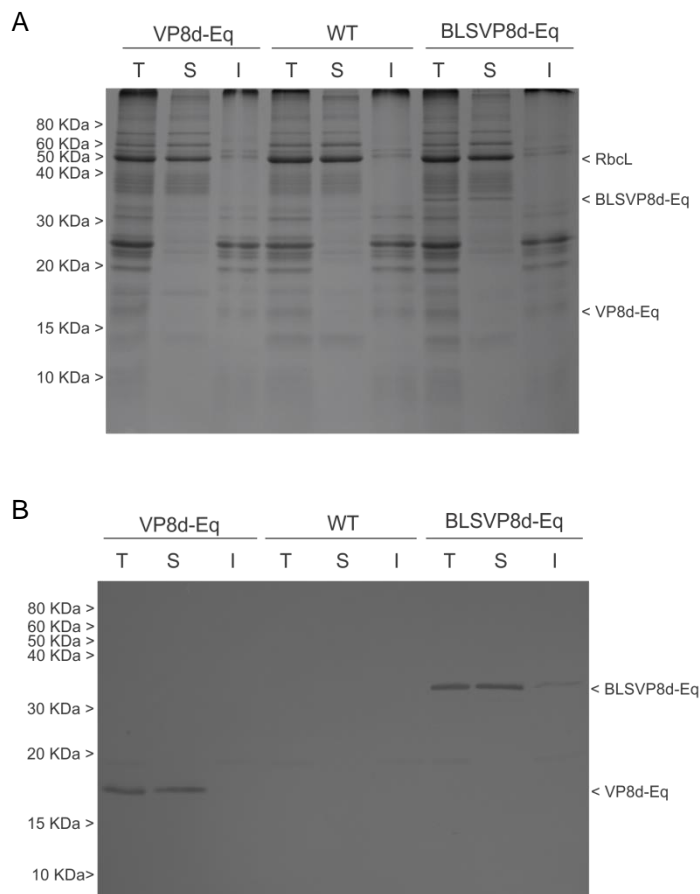


Figura 36. Análisis de la solubilidad de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en extractos obtenidos a partir de hojas frescas. (A) Gel SDS-PAGE 15% teñido con *Coomassie brilliant blue*. (B) *Western blot* revelado con anticuerpos contra VP8* de rotavirus bovino. En cada calle se analizaron extractos equivalentes a 3 mg de tejido fresco. T, S, I: extractos total, soluble e insoluble, respectivamente. Se indican en los márgenes las posiciones de VP8d-Eq, BLSVP8d-Eq, la subunidad mayor de RuBisCo (RbcL) y el marcador de peso molecular (Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard, Invitrogen).

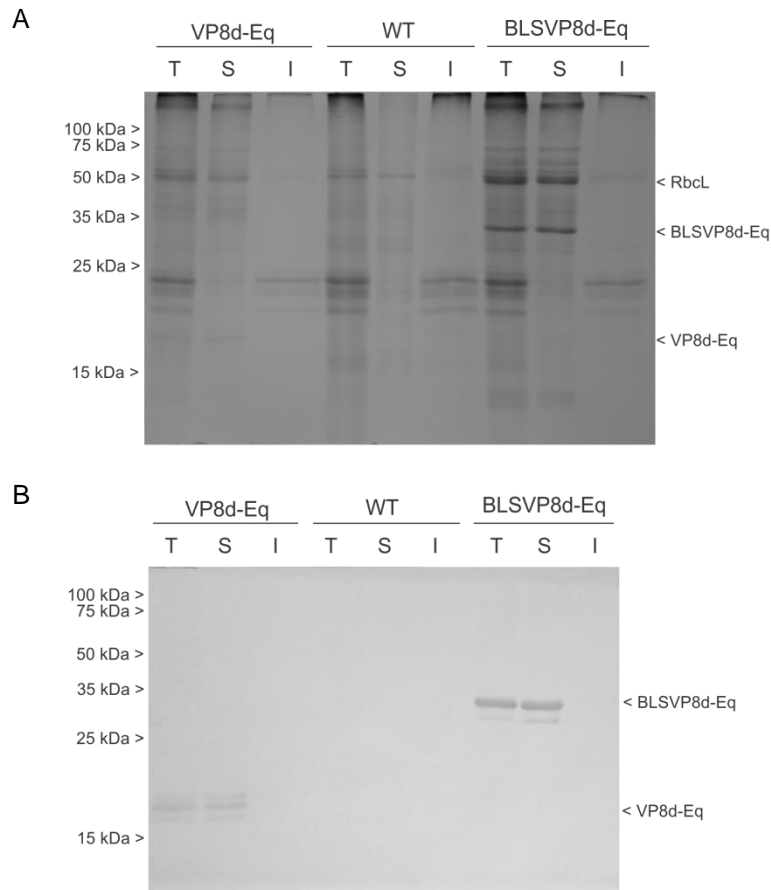


Figura 37. Análisis de la estabilidad y solubilidad de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en extractos obtenidos a partir de hojas liofilizadas. (A) Gel SDS-PAGE 15% teñido con *Coomassie brilliant blue*. (B) *Western blot* revelado con anticuerpos contra VP8* de rotavirus bovino, los cuales cruzan parcialmente con VP8d-Eq. T, S, I: extractos total, soluble e insoluble, respectivamente. WT: *wild-type*. Se analizaron extractos obtenidos equivalentes a 0,2 y 0,25 mg de tejido liofilizado en el caso de plantas transplásticas y no transformadas, respectivamente. Se indican en los márgenes las posiciones de VP8d-Eq, BLSVP8d-Eq, la subunidad mayor de RuBisCo (Rbcl) y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega).

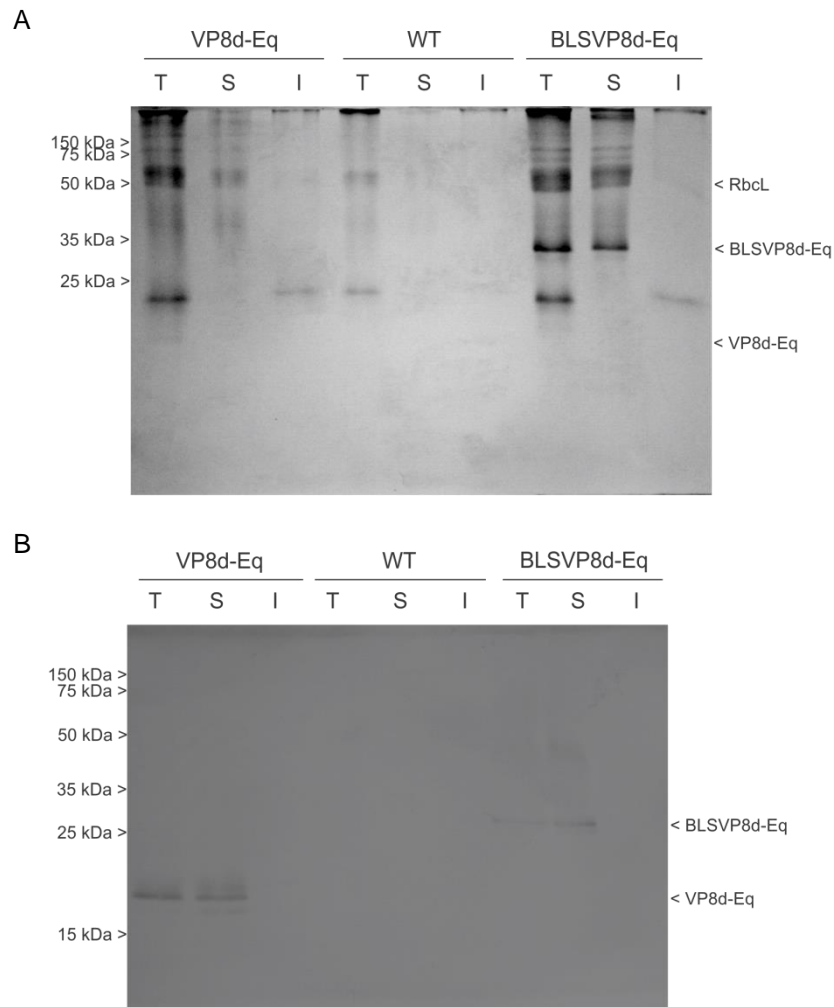


Figura 38. Análisis de la estabilidad y solubilidad de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en hojas liofilizadas almacenadas por un mes a temperatura ambiente. (A) Gel SDS-PAGE 15% teñido con *Coomassie brilliant blue*. (B) *Western blot* revelado con anticuerpos contra VP8* de rotavirus bovino, los cuales cruzan parcialmente con VP8d-Eq. Se analizaron extractos obtenidos a partir de 0,25 mg de tejido liofilizado. T, S, I: extractos total, soluble e insoluble, respectivamente. WT: *wild-type*. Se indican en los márgenes las posiciones de VP8d-Eq, BLSVP8d-Eq, la subunidad mayor de RuBisCo (Rbcl) y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega).

Para evaluar la posibilidad de almacenar las proteínas recombinantes de manera simplificada que no requiriera frío, se repitió el análisis de solubilidad luego de un mes de almacenamiento de las mismas muestras liofilizadas a temperatura ambiente. El patrón de solubilidad de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq permaneció inalterado, manteniéndose ambas proteínas recombinantes en su forma mayoritaria soluble (**Figura 38**).

Acumulación y estabilidad de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq a lo largo del desarrollo de las plantas transplastómicas

Con el objeto de analizar la estabilidad de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq, se analizó su expresión en extractos obtenidos a partir de hojas de diferentes edades de una misma planta.

En el caso de VP8d-Eq la proteína recombinante se acumuló rápidamente en las hojas jóvenes y mostró ser estable tanto en hojas maduras como en hojas senescentes, no evidenciándose en ningún caso proteólisis significativa. Los mayores niveles de expresión fueron, por tanto, observados en las hojas de mayor edad en las que, debido a la senescencia, gran parte del contenido proteico endógeno de la hoja resultó degradado (**Figura 39**).

En el caso de BLSVP8d-Eq la proteína recombinante no se acumuló tan rápidamente. La misma no pudo ser detectada en las hojas más jóvenes. En su lugar, se registró una acumulación gradual con la edad, observándose los mayores niveles de expresión en hojas maduras y más viejas (**Figura 40**).

En ambos casos pudieron observarse bandas diferenciales en los geles teñidos con *Coomassie brilliant blue* y los ensayos de *western blot* confirmaron la identidad de las mismas. En el caso de VP8d-Eq se trató más bien de una banda de intensidad diferencial respecto al control no transformado (**Figuras 39 y 40**).

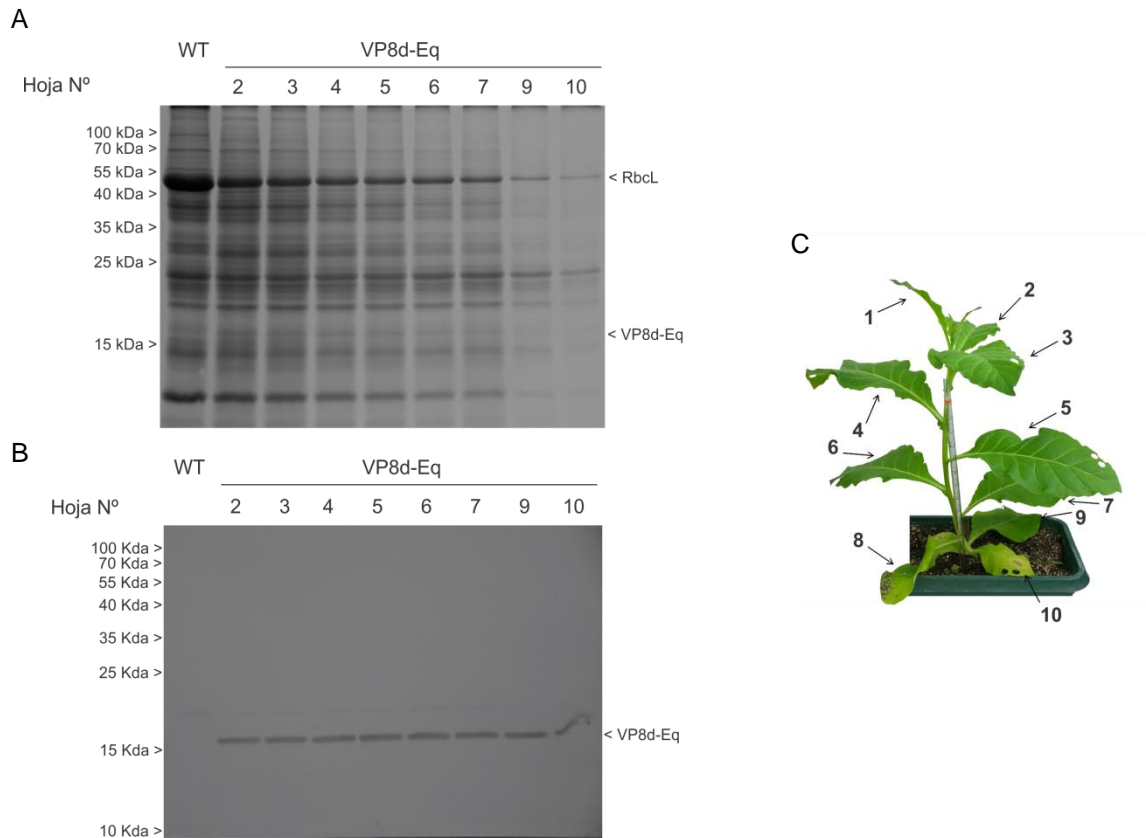


Figura 39. Caracterización de la acumulación de VP8d-Eq a lo largo del desarrollo de una planta transplastónica. (A) Gel SDS-PAGE 15% teñido con *Coomassie brilliant blue*. **(B)** *Western blot* revelado con anticuerpos contra VP8* de rotavirus bovino, los cuales cruzan parcialmente con VP8d-Eq. Todas las calles contienen extractos proteicos totales derivados de 3 mg de tejido foliar fresco. Se indican las posiciones de VP8d-Eq, RbcL y el marcador de peso molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder, Invitrogen) en los márgenes. **(C)** Planta utilizada en el estudio. Las hojas fueron numeradas de acuerdo a su edad desde el ápice a la base, siendo la más joven la primer hoja completamente expandida. WT: *wild-type*.

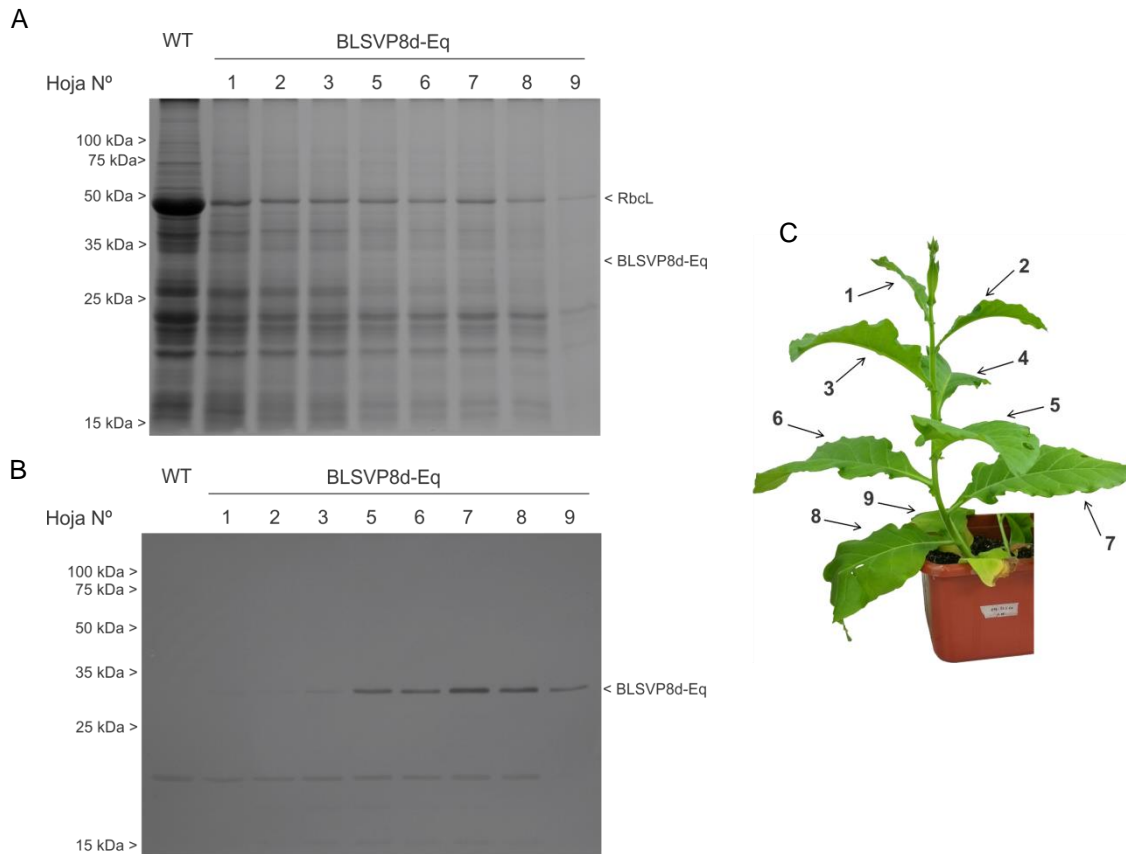


Figura 40. Caracterización de la acumulación de BLSVP8d-Eq a lo largo del desarrollo de una planta transplástica. (A) Gel SDS-PAGE 12,5% teñido con *Coomassie brilliant blue*. **(B)** *Western blot* revelado con anticuerpos contra VP8* de rotavirus bovino, los cuales cruzan parcialmente con VP8d-Eq. Todas las calles contienen extractos proteicos totales derivados de 3 mg de tejido foliar fresco. Se indican las posiciones de BLSVP8d-Eq, RbcL y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega) en los márgenes. **(C)** Planta utilizada en el estudio. Las hojas se numeraron según su edad desde el ápice a la base, siendo la más joven la primer hoja completamente expandida. WT: *wild-type*.

Determinación de los niveles de expresión de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq en hojas de plantas transplásticas

Una vez conocido el perfil de acumulación y estabilidad de ambas proteínas recombinantes a lo largo del desarrollo de una planta se procedió a cuantificar sus niveles de expresión.

Mediante la técnica de Bradford se determinó la cantidad de proteínas solubles totales en extractos obtenidos a partir de hojas maduras (**Figuras 41C y 42C**), tanto en el caso de las plantas transplásticas que expresan VP8d-Eq como BLSVP8d-Eq. Luego, se analizaron los niveles de expresión de las proteínas recombinantes mediante densitometría en geles de

poliacrilamida comparando contra una curva estándar realizada con albúmina sérica bovina (BSA).

La cuantificación se llevó a cabo en una primera instancia a partir de hojas frescas. Al mismo tiempo se procedió a la liofilización del material remanente proveniente de la misma hoja analizada. Una vez finalizado este proceso se realizó una cuantificación adicional equivalente a partir de las hojas liofilizadas. En ambos casos se observó un aumento en los niveles de expresión producido por la disminución del contenido proteico endógeno de la hoja (**Figuras 41 y 42**).

Los niveles cuantificados para **VP8d-Eq** fueron de alrededor de:

-Hoja Fresca: 1,85% de Proteína Soluble Total (PST) o 54 µg/g Tejido Fresco (TF) (**Figura 41A**).

-Hoja Liofilizada: 2,22% de Proteína Soluble Total (PST) o 585,40 µg/g Tejido Liofilizado (TL) (**Figura 41B**).

Los niveles cuantificados para **BLSVP8d-Eq** fueron de alrededor de:

-Hoja Fresca: 4,33% de Proteína Soluble Total (PST) o 401 µg/g Tejido Fresco (TF) (**Figura 42A**).

-Hoja liofilizada: 8,68% de Proteína Soluble Total (PST) o 3,86 mg/g Tejido Liofilizado (TL) (**Figura 42B**).

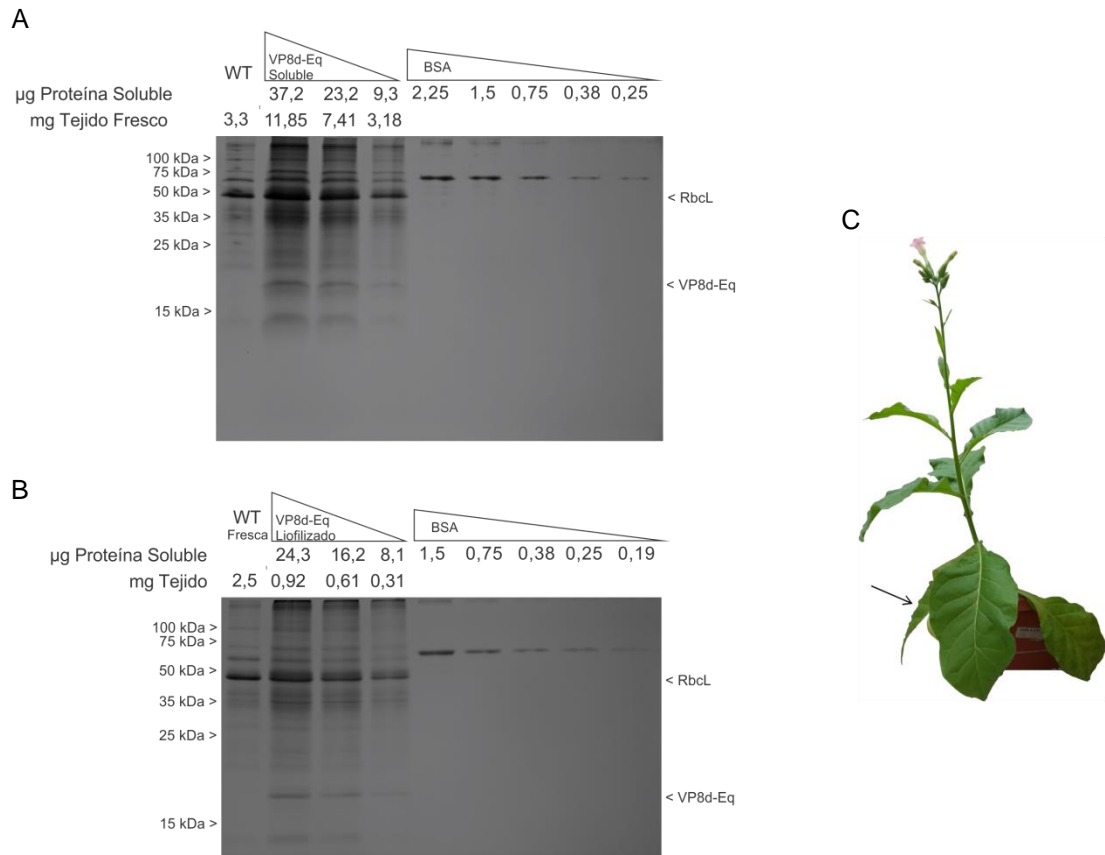


Figura 41. Cuantificación de VP8d-Eq soluble en extractos obtenidos a partir de hoja fresca y liofilizada. (A) y (B) Geles SDS-PAGE 15% teñidos con *Coomassie brilliant blue* en los que se sembraron diferentes cantidades de proteínas solubles totales de una hoja transplastónica de edad avanzada fresca o liofilizada, respectivamente. Se cuantificó VP8d-Eq contra curvas de calibración construidas con BSA. Se utilizaron extractos *wild-type* como control. Se indican las posiciones de VP8d-Eq, la subunidad mayor de RuBisCo (RbcL) y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega) en los márgenes. **(C)** La flecha indica la hoja utilizada en ambos estudios.

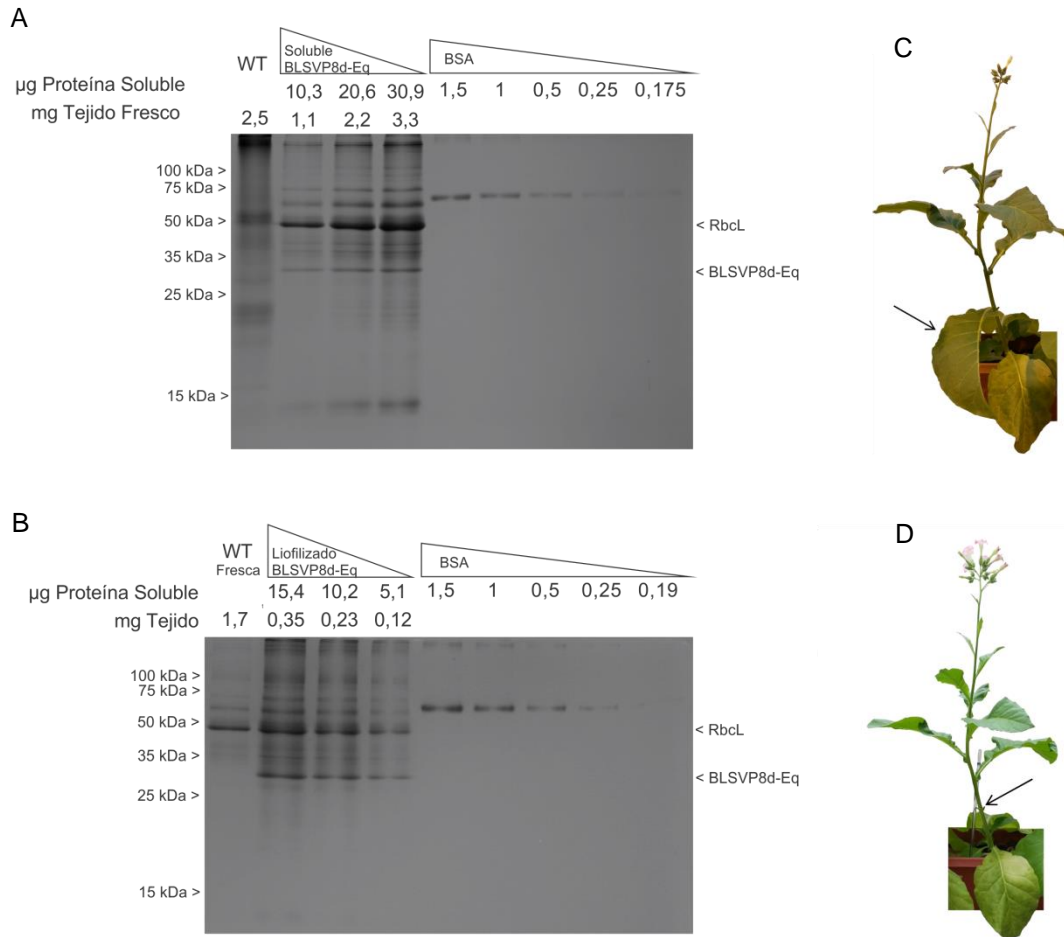


Figura 42. Cuantificación de BLSVP8d-Eq soluble en extractos obtenidos a partir de hoja fresca y liofilizada. (A) y (B) Geles SDS-PAGE 15% teñidos con *Coomassie brilliant blue* en los que se sembraron diferentes cantidades de proteínas solubles totales de un hoja transplastómica de edad avanzada fresca o liofilizada, respectivamente. Se cuantificó BLSVP8d-Eq contra curvas de calibración construidas con BSA. Se utilizaron extractos *wild-type* como control. Se indican las posiciones de BLSVP8d-Eq, la subunidad mayor de RuBisCo (RbcL) y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega) en los márgenes. **(C)** La flecha indica la hoja fresca utilizada. **(D)** Estado de la planta al tomar el remanente de la misma hoja al momento de ser liofilizada.

Inmunogenicidad de VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq obtenidas a partir de plantas transplastómicas

Se decidió utilizar el mismo modelo de gallinas ponedoras validado con anterioridad para el caso de BLSVP8d-Bov para evaluar la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq producidas en plantas transplastómicas. Los animales recibieron tres dosis conteniendo 2 μg de VP8d-Eq o 3,83 μg de BLSVP8d-Bov (de los cuales 2 μg correspondieron a VP8d) en los días 0, 30 y 75. Luego de transcurrida una semana de la última inmunización se recolectaron los huevos aproximadamente cada 7 días durante 3 semanas (**Figura 43**). Teniendo en cuenta que los anticuerpos policlonales contra VP8* de rotavirus bovino cruzaban parcialmente con VP8d de rotavirus equino permitiendo su revelado durante los ensayos de *western blot*, se decidió emplear el mismo protocolo de ELISA adsorbiendo VP8* de rotavirus bovino a las placas para detectar la presencia de anticuerpos IgY específicos contra VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq. La sensibilidad de este protocolo no fue suficiente para comparar con claridad la presencia de anticuerpos específicos en las diferentes fracciones de yema de huevo purificada luego de inocular los animales con extractos solubles provenientes de hojas frescas o liofilizadas que expresaban VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq (no se muestra). Como no se contaba con VP8d-Eq purificada para ser adsorbida en placa no resultó factible llevar a cabo un ensayo de ELISA más adecuado que permitiera extraer resultados concluyentes. Es por este motivo que se decidió realizar directamente un ensayo de neutralización viral *in vitro* para detectar anticuerpos IgY neutralizantes específicos en yema de huevo capaces de inhibir la infección por rotavirus equino. Al momento de redacción de la presente tesis estos ensayos, utilizando las fracciones de yema de huevo obtenidas a partir de la inmunización con extractos solubles de hoja fresca y liofilizada, se encuentran aún en curso.

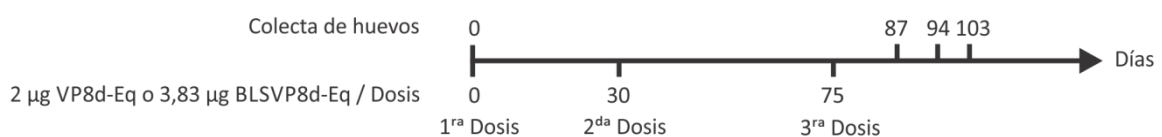


Figura 43. Esquema empleado para los ensayos de inmunización con extractos de proteínas de plantas transplastómicas.

PARTE III Utilización y evaluación del gen de flavodoxina de *Anabaena sp.* como nuevo selector para la transformación de plástidos.

Introducción

Las ferredoxinas (Fd) son pequeñas proteínas (11 kDa) ubicuas solubles de tipo hierro-azufre [2Fe-2S] que participan de reacciones redox de transferencia de electrones tanto en procariotas como en plantas y animales (Hase et al., 2006). Estas proteínas constituyen el transportador móvil de electrones de menor potencial más importante de los cloroplastos, derivando los equivalentes de reducción generados por la cadena de transporte de electrones fotosintética de a uno a la vez hacia otras reacciones para que estos sean consumidos. Las Fd son reducidas por el fotosistema I y transfieren los electrones a varias enzimas involucradas en diversas vías cruciales para la célula (Hase et al., 2006; Knaff, 1996). Entre las cuales se encuentra la Ferredoxina-NADP⁺ Reductasa (para generar el NADPH reducido necesario para la fijación de CO₂ y otras rutas metabólicas) (Carrillo and Ceccarelli, 2003), nitrito reductasa y sulfito reductasa (para la asimilación de nitrógeno y azufre) (Hase et al., 2006), glutamato sintasa y desaturasa de ácidos grasos (para la síntesis de aminoácidos y ácidos grasos, respectivamente). Además, las Fd participan del sistema ferredoxina-tiorredoxina junto a la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR) (Scheibe, 1991; Schurmann and Buchanan, 2008), mediante el cual permiten la reducción de enzimas clave para el ciclo de Calvin, la lanzadera de malato y otros procesos metabólicos y disipativos (Balmer et al., 2003)(como la regeneración de antioxidantes como el ascorbato y peroxirredoxinas)(Dietz et al., 2006; Miyake and Asada, 1994). Las Fd también participan de reacciones de flujo cíclico de electrones para disipar los equivalentes de reducción generados excesivamente por la cadena de transporte de electrones bajo situaciones fisiológicas y de estrés para evitar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que resultan extremadamente dañinas para la célula (**Figura 44**)(Shikanai, 2007). Muchas de estas funciones también están presentes en algas eucariotas y cianobacterias, las cuales están evolutivamente relacionadas al endosimbionte del cual se originan los cloroplastos (Falk et al., 1995). Los niveles de Fd en estos microorganismos fotosintéticos, y también en plantas, se ven reducidos frente a condiciones ambientales adversas, por factores bióticos y abióticos, que causan acumulación de ROS (Apel and Hirt, 2004; Ceccoli et al., 2011; Erdner et al., 1999; Mazouni et al., 2003; Singh et al., 2004; Tognetti et al., 2006; Zimmermann et al., 2004).

Tal como ha sido demostrado para cianobacterias y plantas, mediante experimentos de *knock-down* y ARN de interferencia, las Fd resultan esenciales para las vías metabólicas centrales del cloroplasto, y al disminuir su concentración se ve afectada la viabilidad celular.

Como resultado se observa un arresto del crecimiento, una menor tasa fotosintética y de asimilación de CO₂ y una distribución alterada de los equivalentes de reducción (Blanco et al., 2011; Hanke and Hase, 2008; Holtgreffe et al., 2003; Poncelet et al., 1998; Voss et al., 2008). Los intentos para generar plantas de tabaco más tolerantes a distintos tipos de estrés por sobreexpresión de una Fd recombinante dirigida a cloroplastos no han resultado exitosos ya que la expresión del transgén también resulta afectada en presencia de estrés oxidativo (Ceccoli et al., 2011).

En respuesta a la disminución de los niveles de Fd en situaciones de estrés, las cianobacterias y algunas algas eucariotas han desarrollado mecanismos de adaptación mediante un aumento marcado en la expresión de otra proteína soluble y pequeña (19 kDa), denominada flavodoxina (FLD), que utiliza una molécula de flavina mononucleótido como grupo prostético y que cumple una función transportadora de electrones equivalente (Hagemann et al., 1999; Sancho, 2006; Singh et al., 2004). En estos organismos, las FLD son capaces de reemplazar a las Fd para la reducción de Ferredoxina-NADP+ Reductasa y la fijación de nitrógeno y azufre, entre otras reacciones (Saito et al., 2011; Sancho, 2006) (**Figura 44**). Es importante destacar que pese a que las FLD no se han detectado en plantas (se cree que las FLD se perdieron en algún momento durante la evolución de las algas verdes a las plantas vasculares) estas proteínas pueden interactuar *in vitro* con enzimas de plantas (Nogués et al., 2004; Scheller, 1996; Tognetti et al., 2006). De hecho han podido generarse exitosamente plantas transgénicas de tabaco que expresan una FLD de *Anabaena* sp. dirigida a los cloroplastos. De manera extraordinaria, estas plantas fueron capaces de tolerar un amplio rango de adversidades ambientales, desde sequía, altas intensidades lumínicas, calor, frío, radiación UV, salinidad, el herbicida metil viológeno (generador de estrés oxidativo) y otros compuestos propagadores de superóxidos, escases de hierro, presencia de derivados de nitrotolueno o xenobióticos hasta muerte celular inducida por patógenos (**Figura 45**). Mientras que las plantas transformadas expresando FLD en cloroplasto fueron capaces de crecer con normalidad, las plantas que expresaban FLD en citosol y las no transformadas exhibieron una acumulación significativamente mayor de ROS y presentaron daño celular, clorosis, arresto del crecimiento e inhibición de la fotosíntesis y otras rutas metabólicas. (Tognetti et al., 2007a; Tognetti et al., 2006; Tognetti et al., 2007b; Zurbriggen et al., 2009; Zurbriggen et al., 2008). Las plantas que expresaban FLD en cloroplasto tampoco presentaron efectos fenotípicos adversos ocasionados por la expresión del transgén en ausencia de estrés (Tognetti et al., 2006; Tognetti et al., 2007b; Zurbriggen et al., 2009). Cabe destacar que los grados de compensación fenotípica observados estuvieron estrechamente relacionados con la cantidad

de FLD que se expresó y acumuló en los cloroplastos (Tognetti et al., 2007a; Zurbriggen et al., 2008).

En experimentos posteriores realizados por nuestro grupo en colaboración con el grupo del Dr. Néstor Carrillo (IBR, Rosario), plantas transgénicas en las que se disminuyeron los niveles de Fd por silenciamiento post-transcripcional fueron capaces de recuperar el crecimiento normal, la capacidad fotosintética y niveles reducidos de ROS cuando se expresó la proteína FLD desde el genoma nuclear (solo cuando es redirigida a cloroplastos y no en el citosol) o plastídico (empleando nuestro vector pBSW5'UTRFld portando al gen que codifica la proteína FLD). Una vez más, estas plantas no presentaron signos de clorosis y fueron particularmente resistentes a estrés oxidativo (Blanco et al., 2011).

Los resultados obtenidos con anterioridad sugieren que la proteína FLD de cianobacterias está libre de regulación endógena, que puede sustituir funcionalmente a la proteína FD *in vivo* (manteniendo así la homeostasis redox y previniendo la acumulación de ROS) y que la tolerancia a diversos tipos de estrés que esta confiere podría ser aprovechada como sistema de selección alternativo a los tradicionales basados en el uso antibióticos.

Hasta el momento, el gen más eficiente y comúnmente empleado como selector para la transformación de cloroplastos es el gen *aadA* (aminoglucósido 3'-adenil transferasa), el cual confiere resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptomycinina (los cuales se unen irreversiblemente al RNA ribosomal 16S de la subunidad 30S del ribosoma e impiden la síntesis proteica) (Day and Goldschmidt-Clermont, 2011; Goldschmidt-Clermont, 1991). Dado el origen evolutivo de los cloroplastos, las secuencias regulatorias que controlan la expresión de este gen son reconocibles por la maquinaria transcripcional y traduccional procariota. Esta característica, sumada a la gran cantidad de copias de genoma de cloroplasto que existe en una célula transformada (hasta 10.000 copias por célula), incrementaría el riesgo potencial de transferencia horizontal de este gen de resistencia a antibiótico desde las plantas a las bacterias presentes en el medioambiente o incluso en el intestino luego de su consumo. Esta resistencia podría ser luego transferida fácilmente a otras bacterias patogénicas dando lugar a cepas superresistentes (Ceccherini et al., 2003; Day and Goldschmidt-Clermont, 2011; Dufourmantel et al., 2007; lamtham and Day, 2000; Kay et al., 2002; Miki and McHugh, 2004; Pontiroli et al., 2009). Pese a que se ha argumentado la improbabilidad de que esto ocurra y que los riesgos para la salud humana y el medio ambiente son muy escasos (EFSA, 2009; Ramessar et al., 2007; Wögerbauer, 2007), la eliminación o reemplazo de estos genes de resistencia por otros basados en genes de plantas facilitaría el proceso regulatorio para la

aprobación y liberación de una planta transplastómica al medio ambiente (Breyer et al., 2014; Day and Goldschmidt-Clermont, 2011; EC, 2013; EFSA, 2004; EU, 2001).

Teniendo todo esto en cuenta, se decidió evaluar el uso del gen de flavodoxina (*fld*) de *Anabaena* sp. como gen selector y utilizar el herbicida metil viológeno, que genera estrés oxidativo por la producción radicales superóxido (Babbs et al., 1989), y al cloruro de sodio, que genera estrés salino, como agentes selectores.

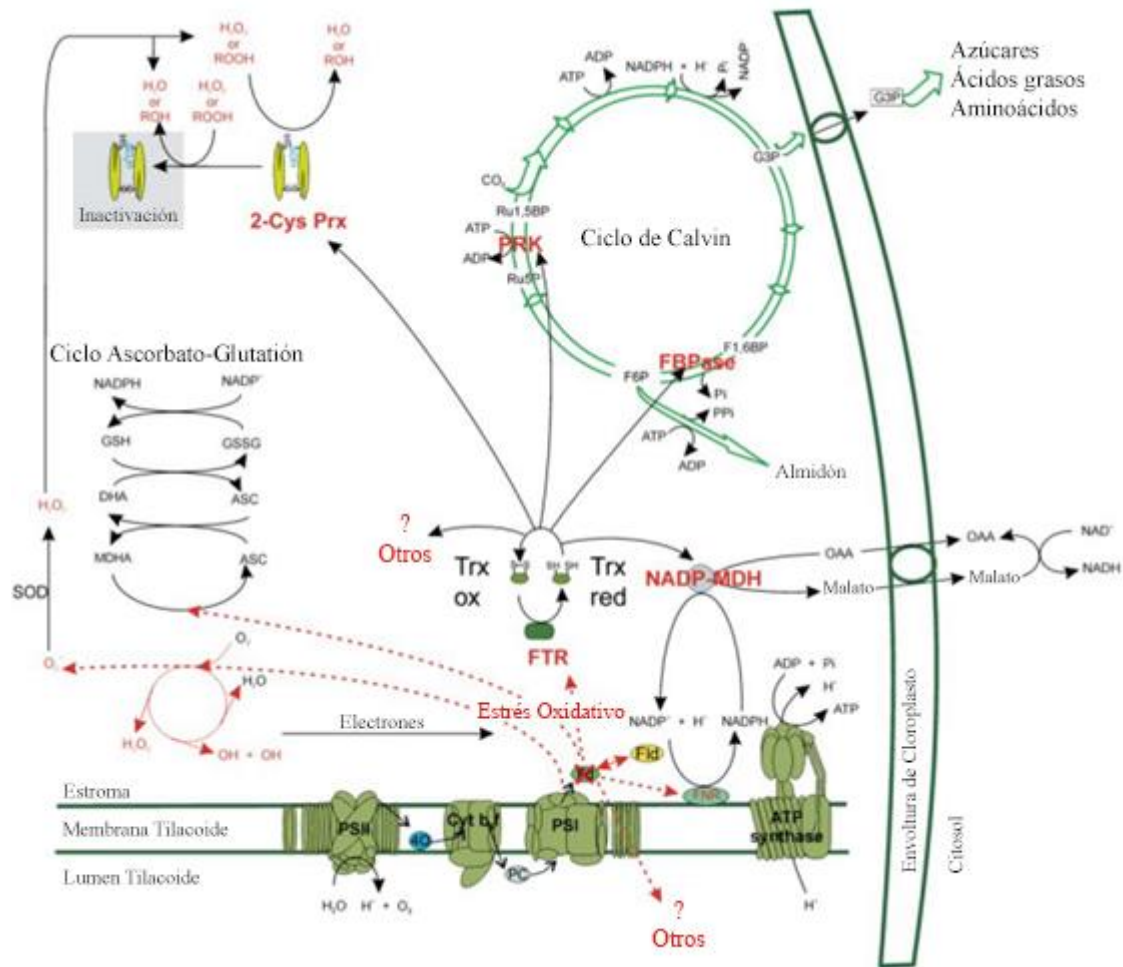


Figura 44. Mecanismo de protecci6n de FLD en cloroplastos. Frente a una situaci6n de estr6s ambiental disminuyen los niveles de FD y se induce la expresi6n de FLD. Los electrones generados por la cadena de transporte de electrones fotosint6tica pueden ser transmitidos desde Fd o Fld al sistema de tioredoxinas (Trx) mediante la FTR. Las Trxs a su vez regeneran las formas activas reducidas de sus enzimas blanco, dando lugar al mantenimiento y/o estimulaci6n del ciclo de Calvin, peroxirredoxinas (Prx), la lanzadera de malato y otras rutas metab6licas. Se muestra tambi6n la transferencia de electrones a la Ferredoxina-NADP+ Reductasa (FNR) y al ciclo de regeneraci6n de ascorbato. ASC: ascorbato; Cyt: citocromo; DHA: dehidroascorbato; FBPase: fructosa-1,6-bisfosfatasa; F1,6BP: fructosa-1,6-bisfosfato; F6P: fructosa 6-fosfato; G3P: gliceraldehido 3-fosfato; GSH y GSSG: glutati6n reducido y oxidado; MDHA: monodehidroascorbato; NADP-MDH: malato deshidrogenasa dependiente de NADP(H); OAA: 6cido oxalac6tico; PC: plastocianina; PRK: fosforibuloquinasa; PSI and PSII: fotosistemas I y II; 4Q: plastoquinona; R5P: ribulosa 5-fosfato; R1,5BP: ribulosa-1,5-bisfosfato; SOD, super6xido dismutasa. Adaptado de (Tognetti et al., 2006).

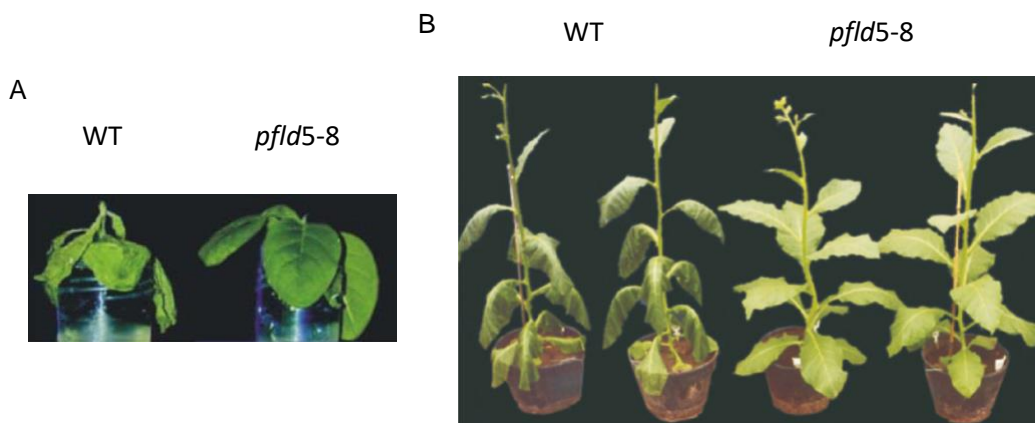


Figura 45. Tolerancia frente a estrés de plantas transgénicas expresando la proteína flavodoxina (FLD) de cianobacteria redireccionada al estroma de cloroplasto. (A) Plantas creciendo en hidroponía expuestas a estrés oxidativo por metil viológeno. Adaptado de (Tognetti et al., 2006). **(B)** Plantas sometidas a estrés hídrico durante 3 días. WT: plantas no transformadas. *pfld5-8*: plantas transgénicas nucleares expresando el gen de flavodoxina en cloroplasto. Adaptado de (Zurbriggen et al., 2008).

Resultados Parte III

Transformación de cloroplastos de tabaco con el vector pBSW-utr/FLD

El vector de transformación pBSW-utr/FLD fue obtenido previamente en nuestro laboratorio por la Dra. María Eugenia Segretin. La secuencia del mismo se chequeó por secuenciación. Previo a la transformación de cloroplastos, realizada *de novo* durante la presente tesis, se corroboró la integridad del vector mediante mapeo de restricción y expresión en *E. coli*. Se obtuvieron extractos proteicos totales de bacterias transformadas con el vector pBSW-utr/FLD que fueron evaluados por SDS-PAGE y *western blot* usando anticuerpos contra FLD. Si bien la proteína recombinante no pudo detectarse mediante tinción con *Coomassie brilliant blue*, el revelado con el anticuerpo mostró una banda diferencial del tamaño esperado para FLD corroborando la integridad y correcta expresión a partir del vector (Figura 46).

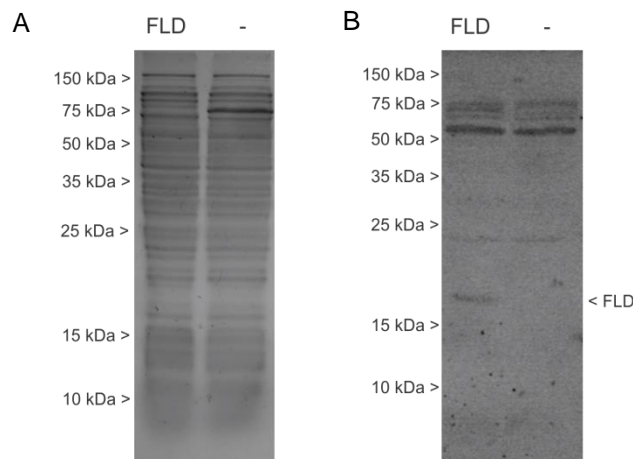


Figura 46. Análisis de la integridad y expresión del vector pBSW-utr/FLD en *E. coli*. (A) Gel SDS-PAGE 15% teñido con *Coomassie brilliant blue*. (B) *Western blot* revelado con anticuerpos contra FLD. Se incluyó un extracto obtenido a partir de bacterias transformadas que expresan una proteína no relacionada (VP-βGUS, 72 kDa) como control negativo. Se indican en los márgenes las posiciones de FLD y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega).

Se obtuvieron varias líneas transplastómicas mediante la técnica de biobalística empleando la construcción pBSW-utr/FLD. La identidad de los brotes regenerados en presencia del agente selector fue determinada por PCR empleando los oligonucleótidos Cloro fw y Cloro rev. Algunos de los brotes obtenidos fueron escapes *wild-type* (presentaron mutaciones espontáneas en el ARN ribosomal 16S que les confirieron resistencia frente al antibiótico espectinomina) y por lo tanto no mostraron amplificación durante la PCR (Figura 47) (Svab et al., 1990).

Las plantas heteroplásticas obtenidas luego de una única ronda de regeneración (heteroplásticas) y confirmadas por PCR fueron analizadas de manera adicional mediante SDS-PAGE y *western blot*. Pudo determinarse la correcta expresión en estas plantas, evidenciándose una banda diferencial correspondiente a FLD tanto por tinción con *Coomassie brilliant blue* como por revelado por *western blot* usando anticuerpos contra FLD (**Figura 48**).

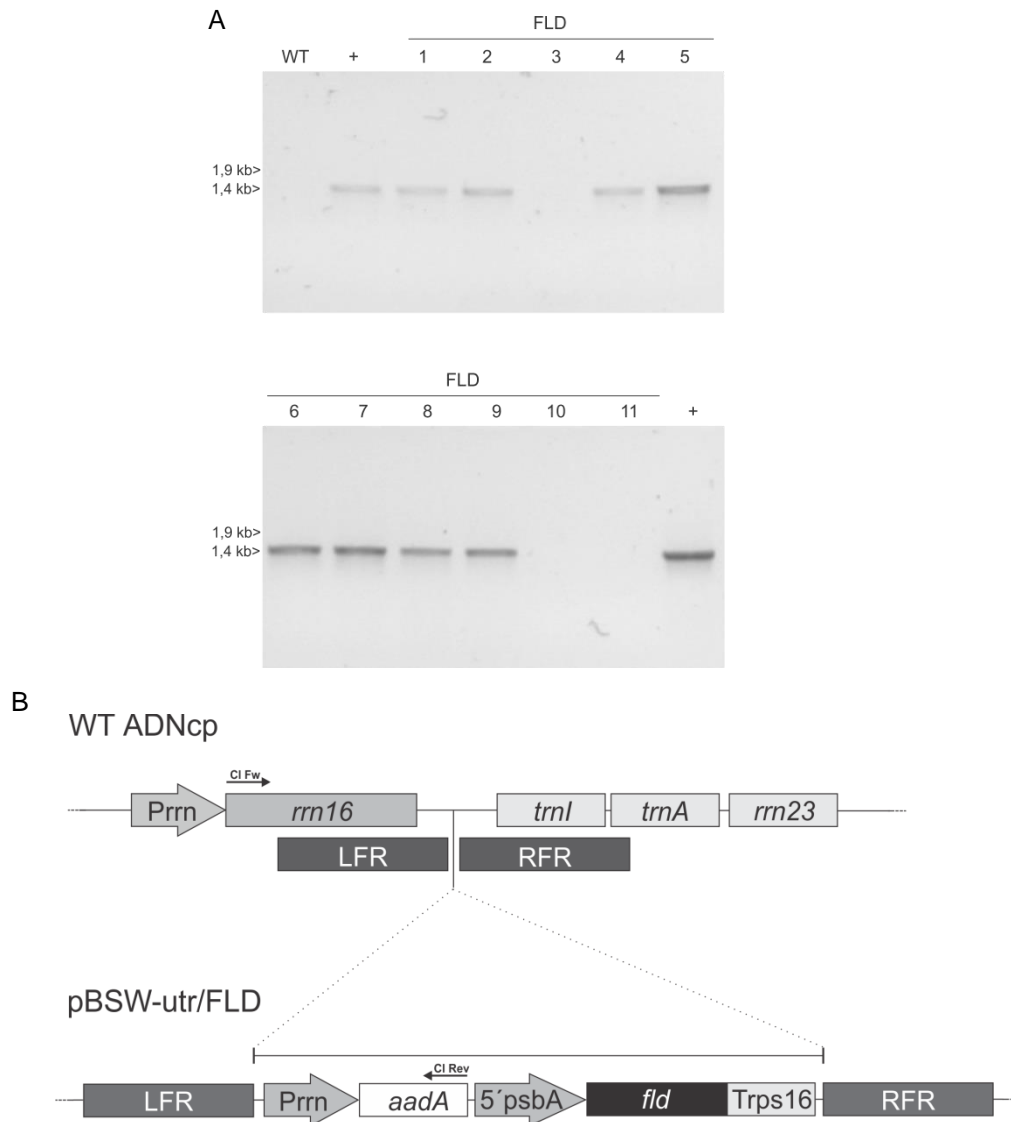


Figura 47. Identificación de las líneas transplastómicas por PCR. (A) Análisis por PCR con los oligonucleótidos iniciadores *Cloro Fw* y *Rev* para confirmar la correcta integración de los transgenes. 1,2, 4-9: líneas independientes. 3, 10 y 11: escapes mutantes no transplastómicos. WT: *wild-type*, control negativo. Se incluyó como control positivo una muestra de una planta transplastómica expresando VP8*. Se incluye en los márgenes la posición del marcador de peso molecular (λ DNA-BstEII Digest, New England Biolabs). **(B)** Esquema que muestra la zona de inserción por recombinación en el genoma plastídico. Se indican los oligonucleótidos empleados en la PCR, los cuales permiten la amplificación de un fragmento de 1450 pb solo en las plantas transplastómicas. LFR y RFR: flancos izquierdo y derecho de recombinación, respectivamente. 5'psbA: secuencia no traducible y promotor fuerte del gen psbA.

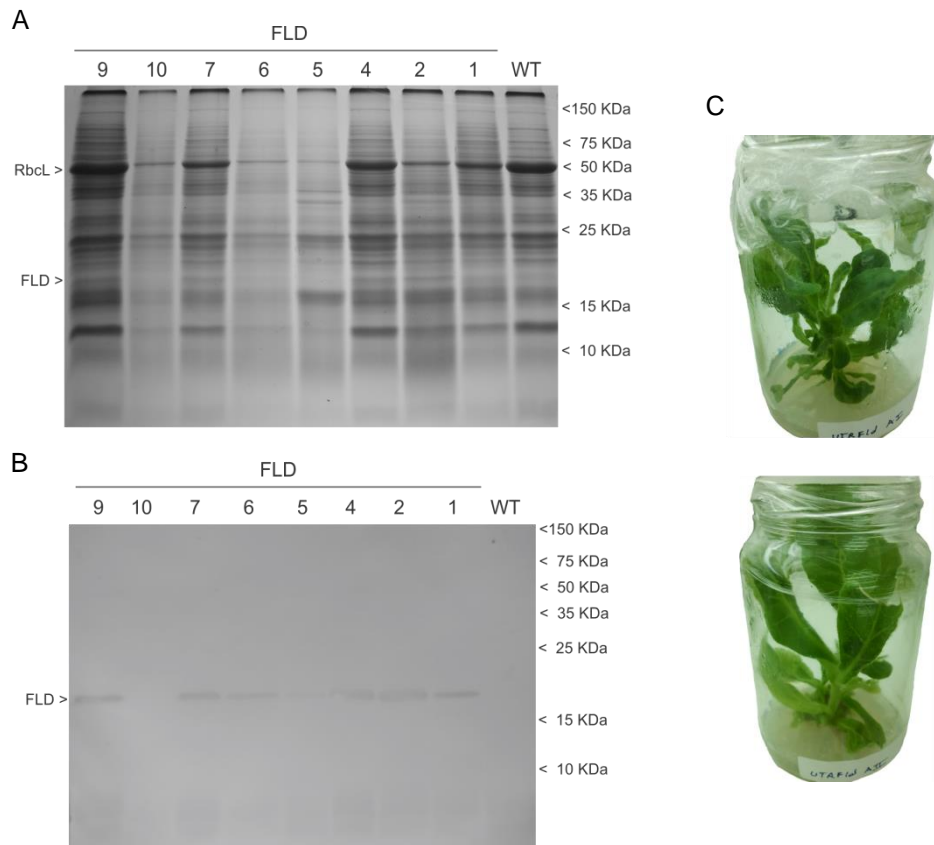


Figura 48. Expresión de BLSVP8d-Bov en las diferentes líneas transplastómicas. (A) Gel SDS-PAGE 15% teñido con *Coomassie brilliant blue* mostrando la expresión de FLD. 1-7, 9: líneas independientes. 10: escape mutante no transplastómico. **(B)** *Western blot* revelado con anticuerpos contra FLD. Se indica la posición de FLD y RbcL. En ambos casos se incluyó como control negativo un extracto proveniente de una planta sin transformar. Todas las calles se sembraron con extractos proteicos provenientes de 2 mg de tejido fresco. Se indican en los márgenes las posiciones de FLD, RbcL y el marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, Promega). **(C)** Fenotipo de algunas de las plantas heteroplásticas empleadas en los ensayos.

Para algunas curvas de regeneración posteriores se decidió usar fragmentos de hoja obtenidos a partir de plantas heteroplásticas generadas durante el desarrollo de esta tesis. Estas plantas constituyeron una primera aproximación que permitió evaluar si en efecto las plantas que portaban el gen de flavodoxina eran capaces de regenerar en presencia del agente selector en cuestión. Al ser heteroplásticas no todas las copias de ADN del cloroplasto presentaron integrado el transgén, situación que se asemejaría a la de brotes recientemente regenerados en un esquema de selección por estrés abiótico. Algunas de estas plantas heteroplásticas presentaron hojas deformadas, producto del arresto de desarrollo de las células con cloroplastos no transformados, como consecuencia de la ausencia de actividad

traduccional en presencia del agente selector espectinomicina (Ahlert et al., 2003) (**Figura 48C**).

Por otra parte, con el objeto de garantizar la homoplastia, fragmentos de hoja de las diferentes líneas heteroplásticas se sometieron a dos rondas adicionales de regeneración, siendo los brotes resultantes enraizados y rusticados, dando finalmente lugar a semillas. La capacidad de las semillas obtenidas para germinar en presencia del agente selector espectinomicina confirmó la estabilidad y transmisión del transgén (**Figura 49**). Tal como se describió en trabajos anteriores, las plantas transplastómicas y las *wild-type* presentaron fenotipos indistinguibles (no se muestra) (Tognetti et al., 2006; Tognetti et al., 2007b; Zurbriggen et al., 2009).

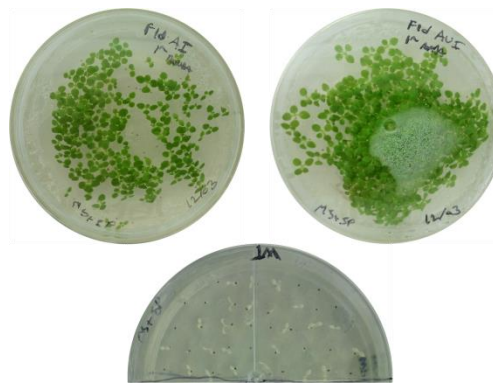


Figura 49. Estabilidad y transmisión del transgén de flavodoxina. Se muestra la capacidad de semillas de algunas de las líneas para germinar en presencia del agente selector espectinomicina. Como control, semillas obtenidas a partir de plantas sin transformar fueron incapaces de germinar y crecer en presencia del selector.

Curvas de regeneración de Nicotiana tabacum cv. Petit Havana en presencia de Metil Viológeno

Se pretendió determinar la concentración mínima de metil viológeno, agente causante de estrés oxidativo, que impide la regeneración de brotes a partir de fragmentos de hoja (explantos) colocados en medio de cultivo conteniendo hormonas y el agente selector.

Por experiencias previas realizadas por nuestro grupo se sabía que el agregado de metil viológeno en altas concentraciones en las placas conteniendo medio de regeneración no era suficiente para producir estrés. Es por ello que se decidió adoptar una estrategia que permitiera el ingreso del agente estresante dentro de las hojas. En una primera instancia se

realizó la inmersión de los explantos en una solución conteniendo medio de cultivo concentrado o diluido y metil viológeno y se aplicó vacío para forzar la entrada del agente causante de estrés en el tejido. Alternativamente, en una estrategia menos agresiva, se realizó una inmersión simple de los explantos en medio de cultivo concentrado o diluido conteniendo el agente estresante, esta vez sin aplicar vacío y durante tiempos más prolongados en oscuridad. Esto se realizó para disminuir la exposición al estrés oxidativo ya que la luz contribuye a la generación de equivalentes de reducción y producción de ROS).

Sin importar la forma de exposición inicial a estrés oxidativo, y por más que la misma haya sido leve, el metil viológeno ocasionó un gran estrés y daño a explantos de hoja sin transformar. La mayor parte del daño ocurrió dentro de la primera semana luego de colocar los fragmentos de hojas en las placas con medio de regeneración y metil viológeno. Se observó muerte generalizada de los fragmentos de hoja en todas las concentraciones ensayadas, desde 0,5 μM hasta 1,5 μM . (**Figuras 50, 51 y 52**). En el caso de la permeabilización mediante vacío, no se observaron diferencias al emplear medio líquido diluido o concentrado (**Figura 51**).

Uno de los problemas encontrados con las metodologías empleadas fue que la permeabilización del metil viológeno en todo el tejido no fue lo suficientemente homogénea. Aun a concentraciones del compuesto suficientes para producir la muerte de los fragmentos, existieron pequeñas zonas con menor permeabilización que fueron capaces de sobrevivir y regenerar dando un elevado número de brotes (**Figura 50, 51 y 52**). Otra de las complicaciones encontradas fue que los procesos empleados para permeabilizar el tejido disminuyeron sustancialmente la eficiencia de regeneración, tal como se observó en los controles de regeneración sin metil viológeno. (**Figura 53**).

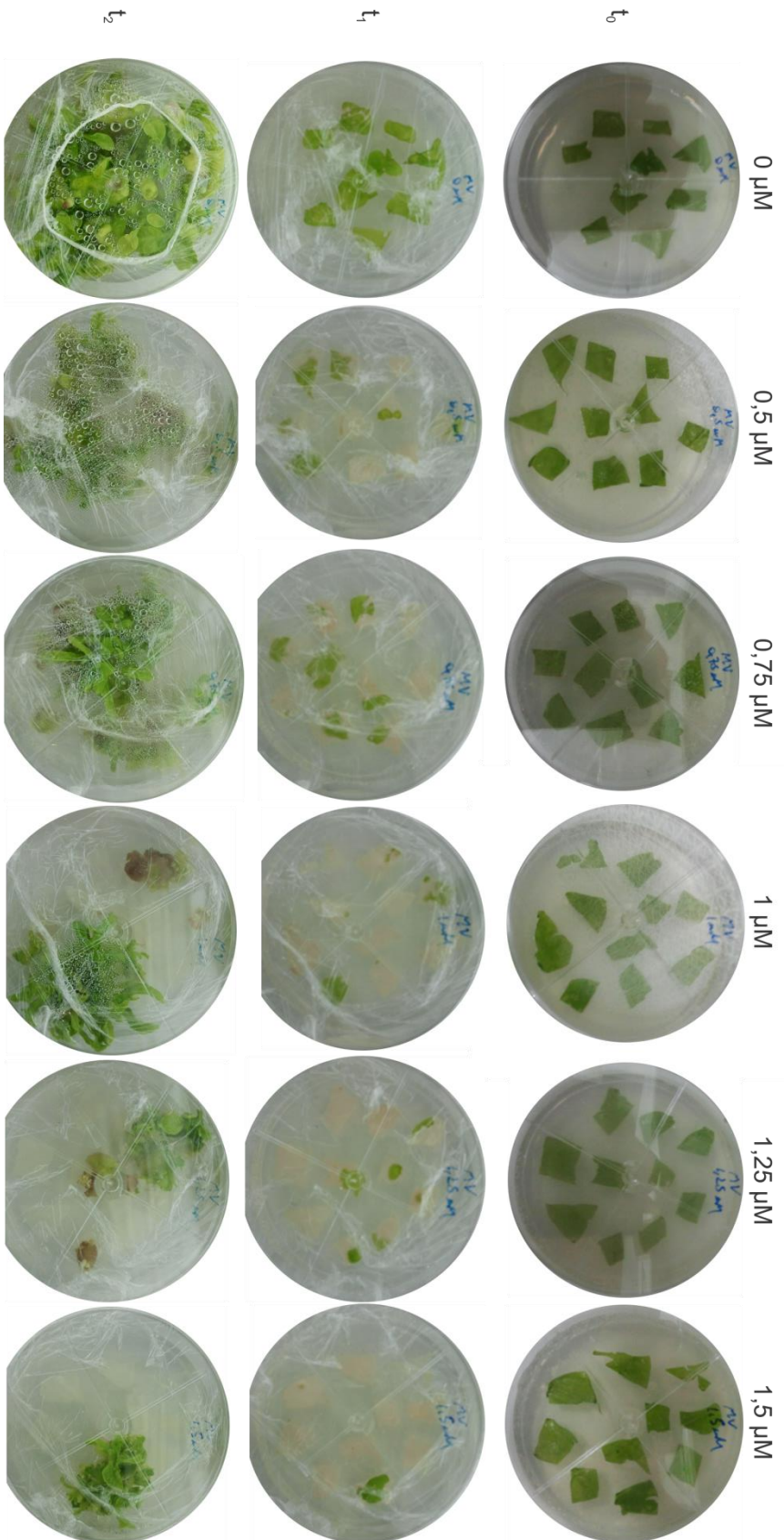


Figura 50. Regeneración de explantos sin transformar en placas conteniendo hormonas y distintas concentraciones de metil viológeno (μM), luego de infiltración por vacío del agente estresante a concentraciones equivalentes. t_0 : inicio, t_1 : 4 días, t_2 : 38 días.

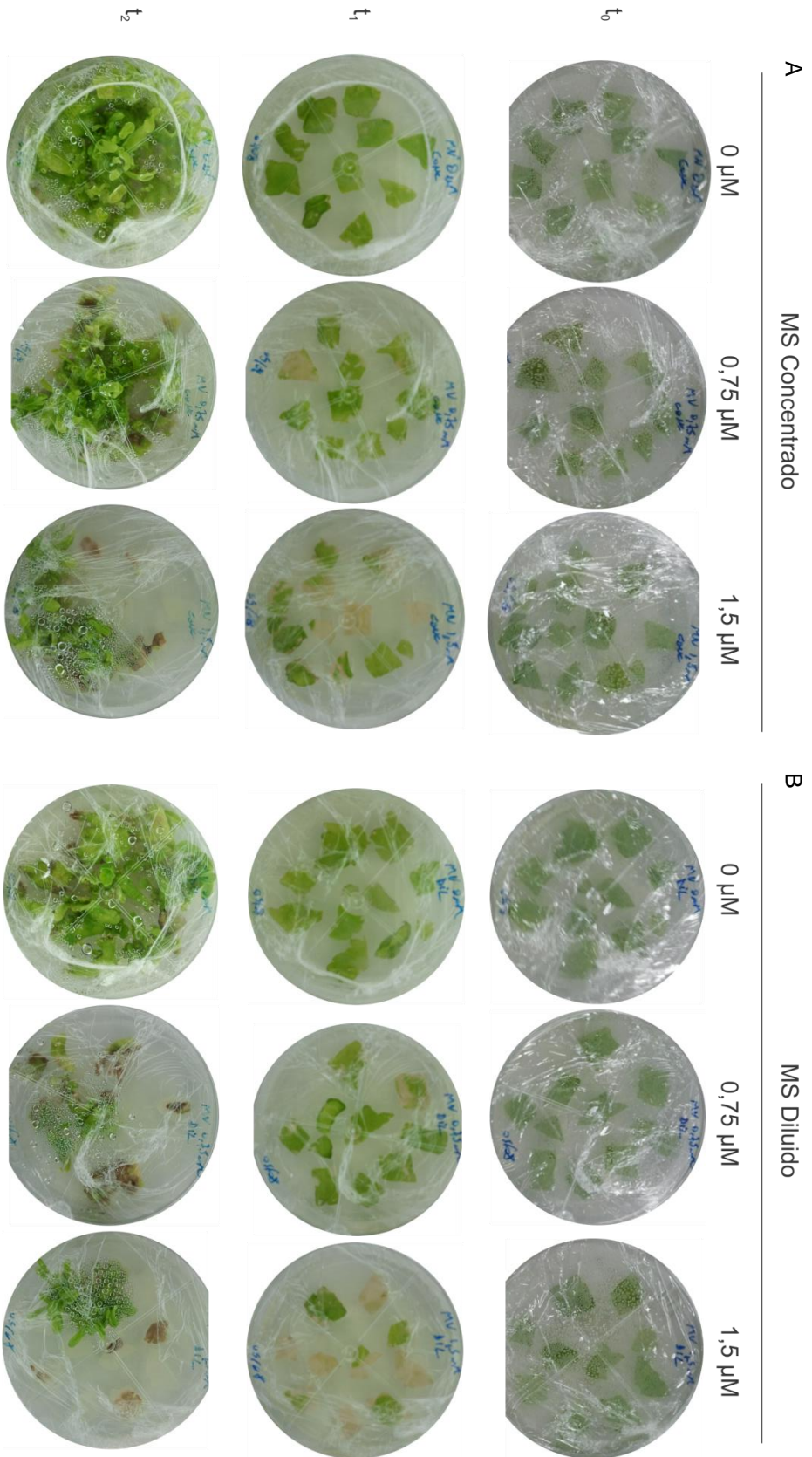


Figura 51. Regeneración de explantos sin transformar en placas conteniendo hormonas y distintas concentraciones de metil viológeno (μM), luego de distintas formas de infiltración por vacío del agente estresante a concentraciones equivalentes. (A) Infiltración en medio de cultivo líquido concentrado. (B) Infiltración en medio de cultivo líquido diluido. t₀: inicio, t₁: 4 días, t₂: 38 días.

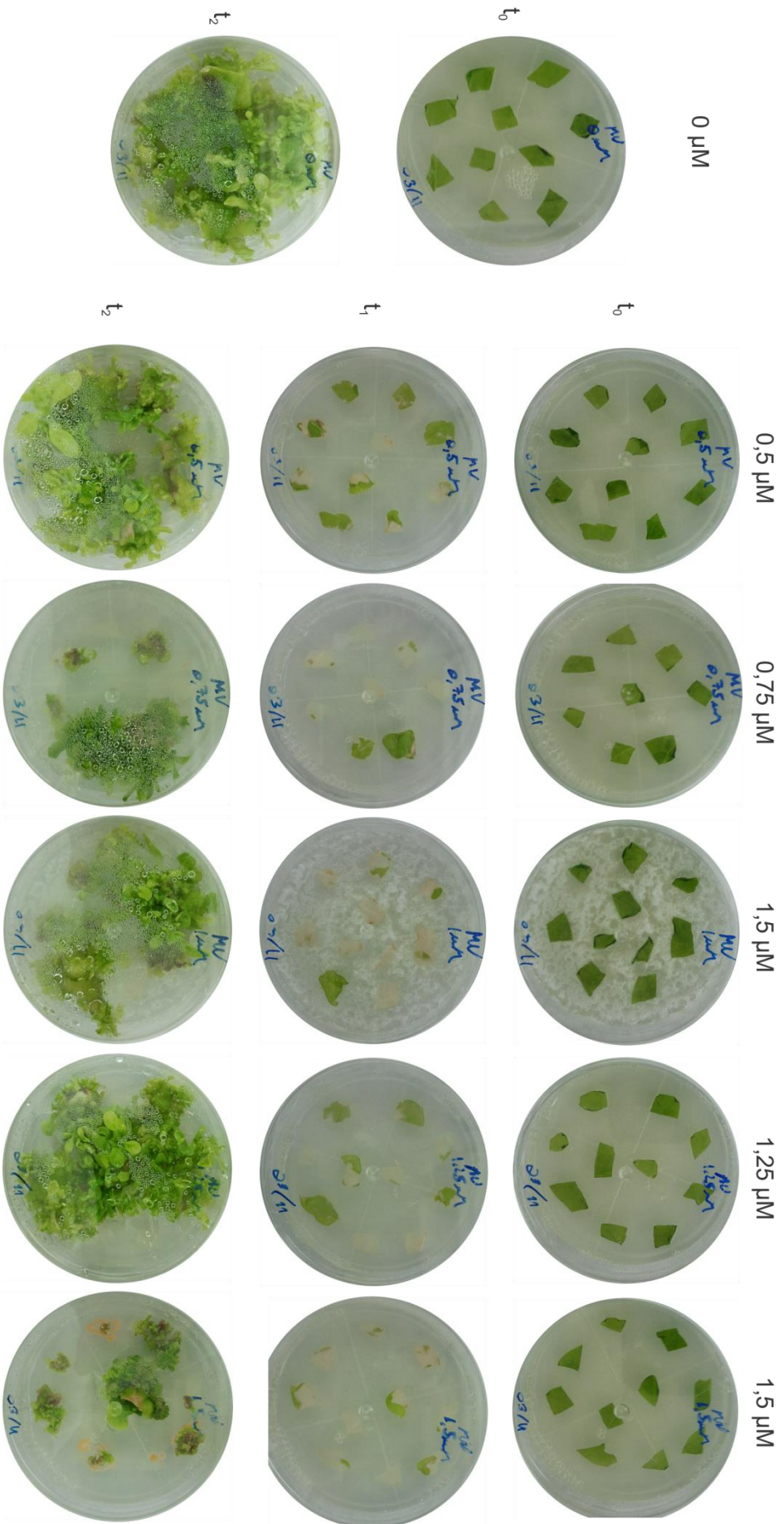


Figura 52. Regeneración de explantos sin transformar en placas conteniendo hormonas y distintas concentraciones de metil viológeno (μM), luego de inmersión en una solución conteniendo el agente estresante a concentraciones equivalentes. t₀: inicio, t₁: 4 días, t₂: 39 días.

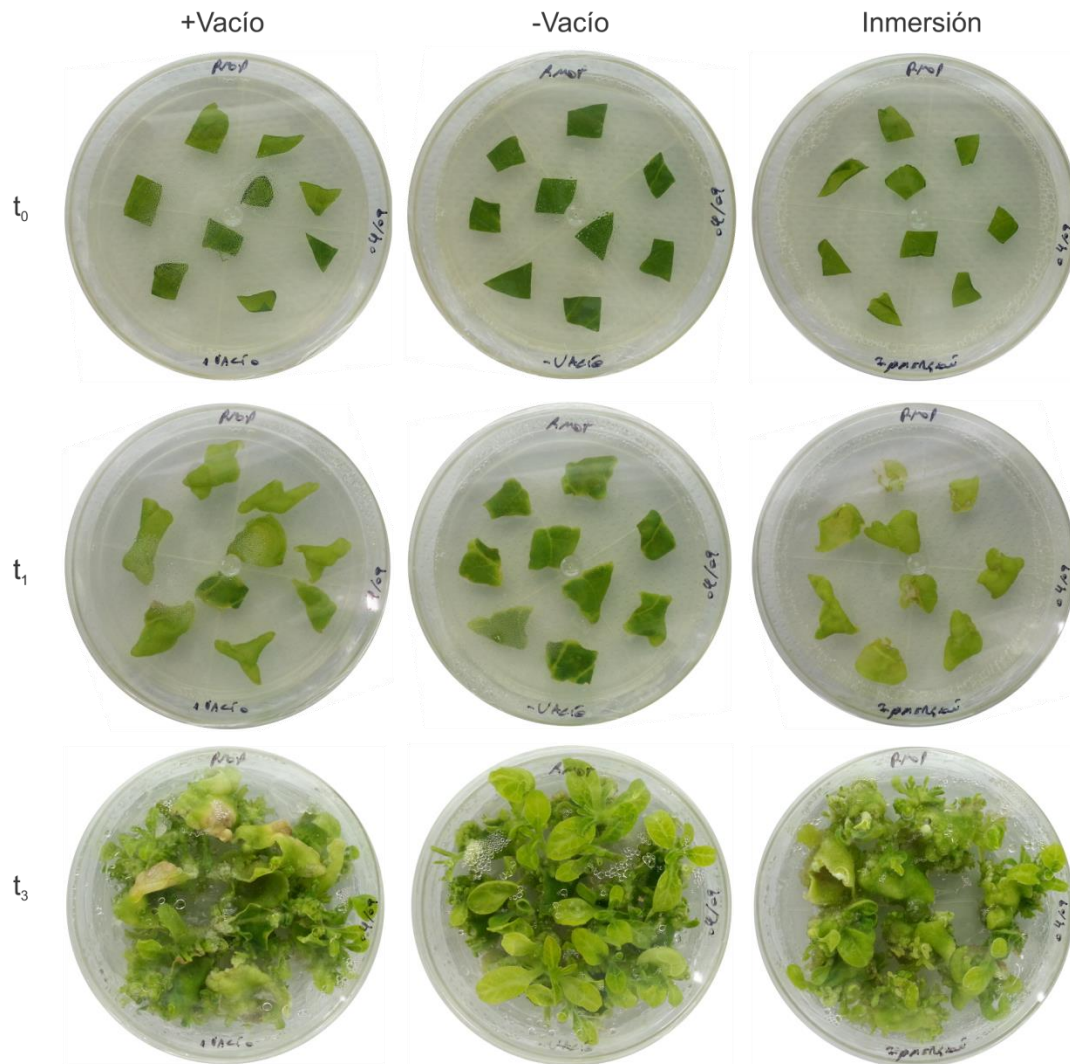


Figura 53. Controles de permeabilización y posterior regeneración de explantos sin transformar. Se muestran los efectos de la permeabilización por vacío o inmersión en comparación con un control no tratado. t_0 : inicio, t_1 : 7 días, t_2 : 31 días.

Curvas de regeneración de Nicotiana tabacum cv. Petit Havana en presencia de Cloruro de Sodio

Además de los experimentos de regeneración en presencia de estrés oxidativo empleando metil viológeno como agente selector se decidió emplear una estrategia alternativa y evaluar la regeneración en presencia de estrés salino producido por cloruro de sodio (NaCl).

En el caso del cloruro de sodio, se evidenció un claro gradiente de regeneración dependiente de la concentración de la sal presente en las placas conteniendo medio de cultivo con hormonas. Pudo determinarse que a concentraciones iguales o superiores a 150 mM de NaCl, las plantas *wild-type* dejaron de regenerar. En la concentración mayor (300 mM) incluso pudieron observarse signos de muerte de los explantos (**Figura 54**). En base a estos resultados se refinó la curva de regeneración, haciéndose un análisis más minucioso de la regeneración en concentraciones de NaCl de hasta 150 mM. Se observaron brotes discretos en relación inversamente proporcional a la concentración de la sal y se estableció que a partir de la concentración límite de 115 mM de NaCl los explantos fueron incapaces de regenerar (**Figura 55**).

Por otro lado, en otra instancia se evaluó la regeneración de fragmentos de hojas (obtenidas a partir de plantas transplastómicas heteroplásticas) que expresaban flavodoxina en presencia de concentraciones de NaCl iguales o superiores a 150 mM. Las plantas que expresan flavodoxina fueron claramente más tolerantes a la sal. A las concentraciones en las que anteriormente no se observó regeneración de brotes *wild-type*, los explantos que expresaban flavodoxina fueron capaces de regenerar. Los fragmentos evidenciaron signos de tolerancia y regeneración incluso en concentraciones de 250 y 300 mM de sal. Sin embargo, en presencia de sal en lugar de obtenerse brotes discretos la regeneración se dio exclusivamente en forma de callo. Cabe destacar que los controles en ausencia de sal con explantos que expresaban flavodoxina pudieron regenerar con normalidad dando lugar a numerosos brotes (**Figura 56**).

A continuación se procedió a la regeneración en paralelo de fragmentos de hojas *wild-type* y heteroplásticos expresando flavodoxina. Se probaron concentraciones entre 115 mM (el límite a partir del cual no regeneraron los explantos no transformados) y 150 mM. Llamativamente, los fragmentos de hojas que expresaban flavodoxina mostraron una mayor rapidez para comenzar el proceso de regeneración con respecto a las plantas *wild-type*, tanto en presencia como en ausencia de sal (**Figuras 57 y 58**). Una vez más, en ausencia de sal ambos

tipos de hojas fueron capaces de regenerar en forma de brotes. A pesar de que las concentraciones de sal iguales a 150 mM, o incluso menores, permitieron una regeneración algo más eficiente de brotes discretos a partir de fragmentos expresando flavodoxina, esta regeneración resultó comprometida por la aparición de algunos brotes a partir de los fragmentos *wild-type* sometidos al mismo tratamiento (**Figura 57**).

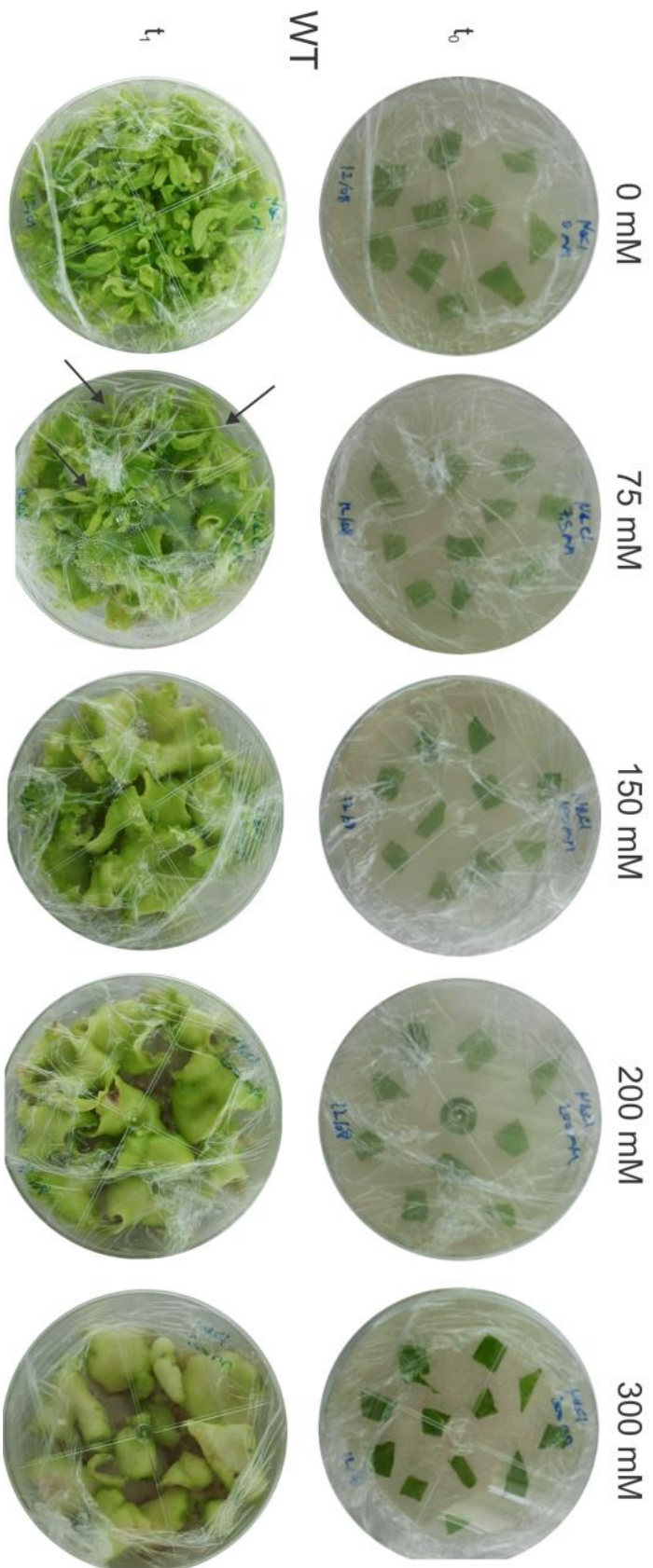


Figura 54. Regeneración de explantos de tabaco no transformados en placas conteniendo hormonas y distintas concentraciones (mM) de cloruro de sodio (NaCl). Las flechas indican la presencia de varios brotes discretos en presencia de NaCl. t_0 : inicio, t_1 : 39 días. WT: *wild type*.

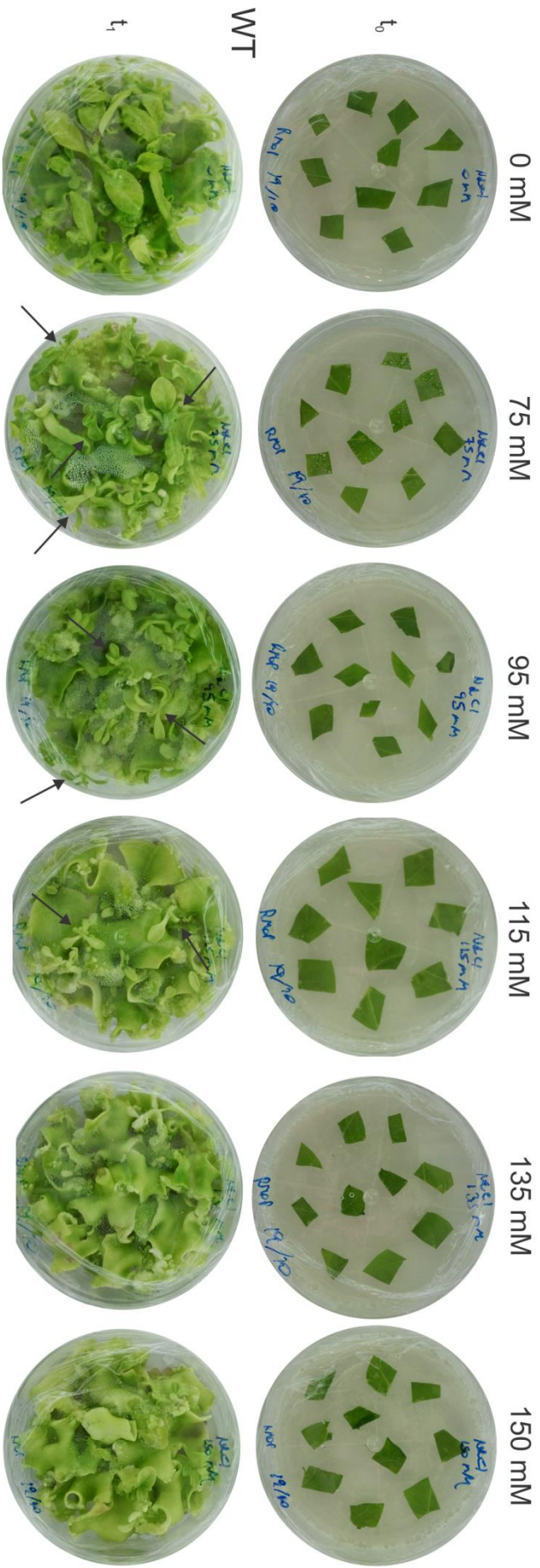


Figura 55. Refinamiento de la regeneración de explantos de tabaco no transformados en placas conteniendo hormonas y distintas concentraciones (mM) de cloruro de sodio (NaCl). Las flechas indican la presencia de varios brotes discretos en presencia de NaCl. t_0 : inicio, t_1 : 37 días. WT: wild type.

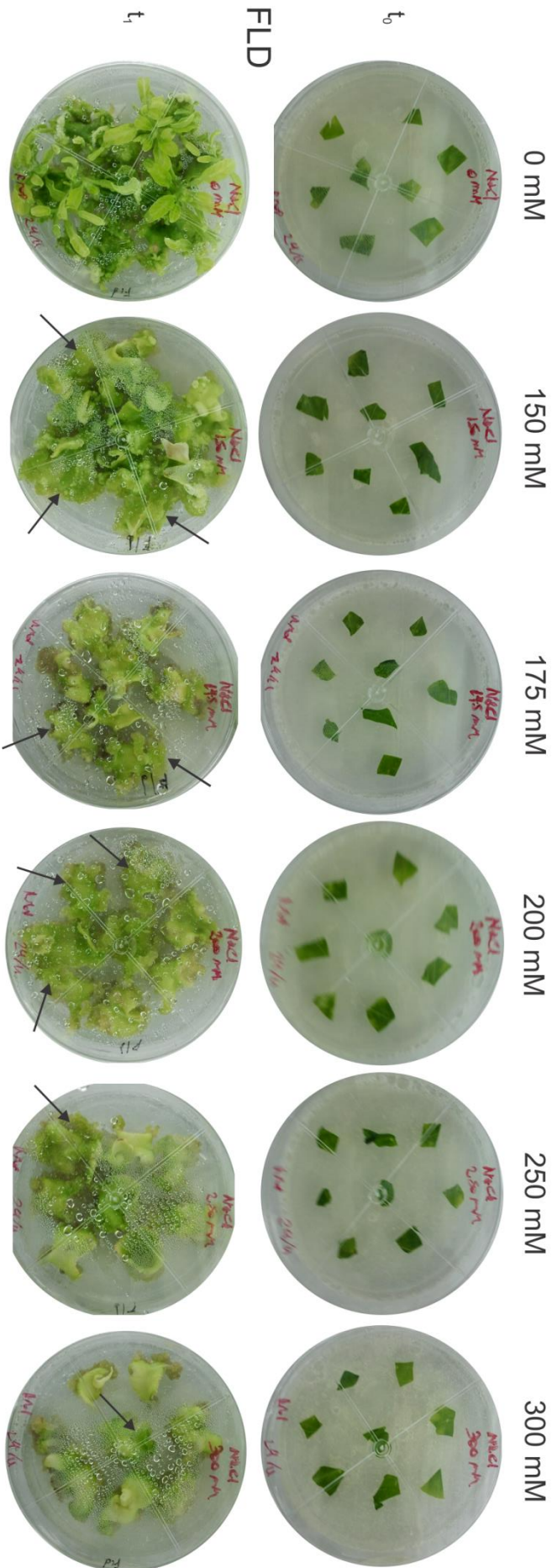


Figura 56. Regeneración de explantos de tabaco heteroplásticos, transformados con el gen de flavodoxina, en placas conteniendo hormonas y distintas concentraciones (mM) de cloruro de sodio (NaCl). Las flechas indican solo algunas de las zonas de regeneración en forma de callo en presencia de NaCl. t_0 : inicio, t_1 : 35 días. FLD: explantos expresando flavodoxina.

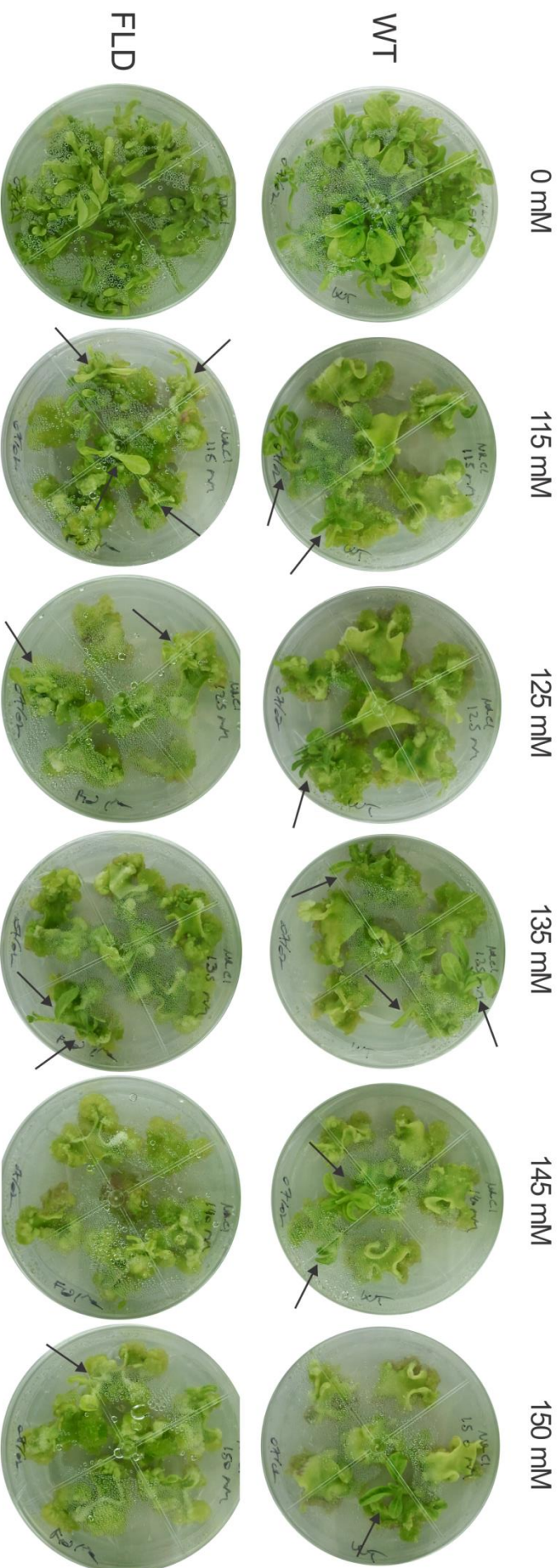


Figura 57. Regeneración en simultáneo de explantos de tabaco no transformados y transformados con el gen de flavodoxina (heteroplásticos), en placas conteniendo hormonas y distintas concentraciones (mM) de cloruro de sodio (NaCl). Las flechas indican la presencia de brotes discretos en presencia de NaCl. Se registró la regeneración de brotes a los 31 días. WT: *wild type*. FLD: explantos expresando flavodoxina.

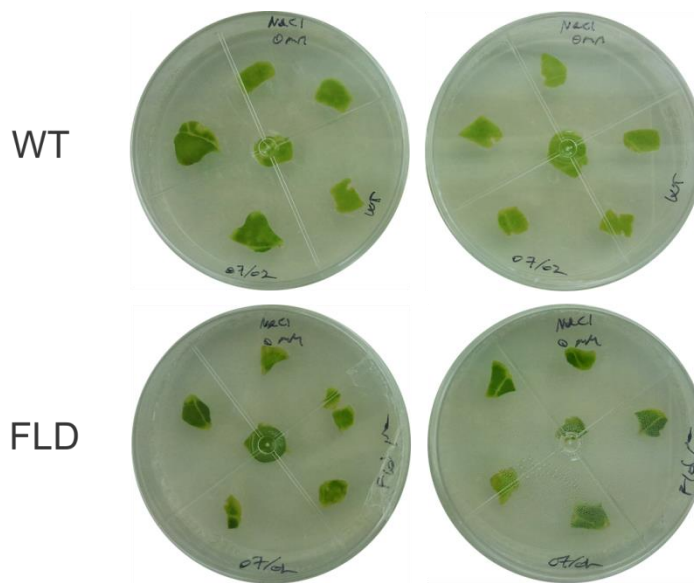


Figura 58. Regeneración diferencial de explantos WT y transplastómicos (heteroplásticos) expresando flavodoxina luego de 6 días en placas conteniendo hormonas en ausencia de sal. La regeneración más temprana en el caso de los explantos expresando flavodoxina se evidenció por un oscurecimiento más rápido de los mismos. WT: *wild-type*. FLD: explantos expresando Flavodoxina.

DISCUSIÓN

Discusión

La transformación del genoma de cloroplasto para la expresión de proteínas recombinantes es un sistema que presenta numerosas ventajas. Resultan de particular interés los bajos costos de producción, la facilidad del escalado, los altos niveles de expresión que suelen obtenerse y que simplifican y abaratan los protocolos de inmunización, la ausencia de patógenos animales o toxinas, la capacidad para introducir modificaciones post-traduccionales, la formación de puentes disulfuro y la mayor bioseguridad respecto a plantas transgénicas nucleares ya que los cloroplastos se heredan por la vía materna estando ausentes en el polen. En los últimos años numerosos estudios han reportado la liofilización de hojas transplastómicas que expresan antígenos vacunales o productos biofarmacéuticos, proceso que permite reducir aún más los costos y facilita el almacenamiento, procesamiento y purificación, dando como resultado protocolos de inmunización más simples y económicos (Rosales-Mendoza, Alpuche-Solis et al. 2009; Soria-Guerra, Alpuche-Solis et al. 2009; Manganeli, Kolotilin et al. 2012; Cardona, Lakshmi et al. 2013; Kwon, Nityanandam et al. 2013; Kwon, Verma et al. 2013).

A través del desarrollo de la presente tesis se reportó por primera vez la producción exitosa de plantas transplastómicas de tabaco que expresan fusiones recombinantes del adyuvante BLS (proteína decamérica altamente inmunogénica proveniente de *Brucella* spp.) a antígenos de interés veterinario. Los antígenos expresados permitieron generar vacunas experimentales a subunidad que fueron evaluadas en un modelo animal de gallinas ponedoras.

En nuestro laboratorio se habían producido recientemente plantas transplastómicas expresando la proteína VP8* de rotavirus bovino C486, la cual constituye un blanco interesante para el desarrollo de vacunas ya que está involucrada en la infectividad y capacidad de generar anticuerpos neutralizantes contra el rotavirus. No solo este antígeno expresado en plantas resultó inmunogénico y protectorio en un modelo de ratón lactante sino que también sus niveles de expresión y estabilidad demostraron ser compatibles con la producción masiva a bajo costo (Lentz, 2011; Lentz et al., 2011). Basándonos en este trabajo previo, durante la primera etapa de esta tesis pudieron obtenerse plantas de tabaco transplastómicas expresando BLSVP8d-Bov, una fusión a BLS de VP8d (un fragmento más corto de la proteína VP8*) de rotavirus bovino C486. Dado que esta proteína de fusión ya había sido producida con éxito en un sistema bacteriano y sus propiedades inmunomodulatorias ya se habían demostrado oportunamente en un modelo de ratón lactante (Bellido et al., 2009) y en otro modelo de gallinas ponedoras (Bellido et al., 2012), resultaba un buen candidato para

analizar sus propiedades inmunogénicas al ser producida de manera novedosa a partir de un sistema de plantas.

Se demostró que BLSVP8d-Bov se expresó de manera soluble y en muy altos niveles en plantas, representando al menos el 40% del contenido de proteínas solubles totales (PST) de la hoja o 4,85 mg/g tejido fresco (TF). Estos niveles están aproximadamente un orden por encima a los niveles obtenidos con plantas transplastómicas expresando VP8* de rotavirus bovino utilizando el mismo vector de transformación (Lentz et al., 2011). A su vez, el rendimiento por gramo de tejido fresco fue 1000 veces mayor al obtenido previamente por la Dra. Marina Mozgovej (Instituto de Virología, CICV y A. INTA-Castelar) mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* utilizando un vector viral derivado del virus del mosaico del tabaco (Mozgovej, 2008) (Pérez Filgueira et al., 2004).

De la misma manera que VP8*, BLSVP8d-Bov se acumuló rápidamente en hojas jóvenes y permaneció estable en hojas maduras y senescentes (Lentz et al., 2011). Al ser estable y dado que el contenido de RuBisCo y otras proteínas disminuye durante proceso de senescencia, BLSVP8d-Bov se fue concentrando a medida que la hoja se hacía más vieja. Esto significó que los niveles de expresión de BLSVP8d-Bov en hojas más viejas fueron aún mayores al 40% de PST obtenido en hojas de edad intermedia (se alcanzaron a detectar niveles de alrededor del 70% de PST). En el caso de las hojas liofilizadas se observó un patrón acrecentado de degradación del contenido proteico propio de la hoja *wild-type*, hecho que contribuyó a concentrar más todavía a la proteína recombinante. Su estabilidad fue tal que no solo permaneció soluble y estable en extractos obtenidos a partir de hojas frescas y congelados durante tiempo prolongado a -70 °C, sino que también presentó este comportamiento en el caso de extractos obtenidos a partir de hojas liofilizadas luego de su almacenamiento durante un mes a temperatura ambiente. Esta última propiedad permitiría reducir costos al eliminar la necesidad de mantener la cadena de frío durante el almacenamiento, transporte y la administración del antígeno vacunal. Además, los altos niveles de expresión obtenidos facilitarían en gran medida, de ser necesaria, su separación de las proteínas propias de la planta (Kwon and Daniell, 2015; Kwon et al., 2013b; Su et al., 2015).

Nuestro grupo había demostrado previamente la capacidad de tabaco transplastómico para producir altas cantidades de proteínas recombinantes sin observar efectos fenotípicos adversos. Tal fue el caso del antígeno peptídico VP1 del virus de la fiebre aftosa (VFA) fusionado a la enzima β -glucuronidasa, en el cual el nivel de expresión (51% de PST) fue claramente mayor al de la proteína más abundante en una hoja *wild-type*, la subunidad mayor

de rubisco (Lentz, Segretin et al. 2009). En este caso, los niveles de BLSVP8d-Bov obtenidos a partir de plantas transplastómicas fueron iguales o aún mayores a los de la subunidad mayor de rubisco, dependiendo de la edad de la hoja seleccionada. A pesar de los altos niveles de expresión, las plantas transplastómicas y las *wild-type* fueron fenotípicamente indistinguibles entre sí. En esta primera instancia, el drástico incremento en los niveles de expresión de BLSVP8d-Bov respecto a VP8* no pudo ser atribuido únicamente a la fusión a BLS ya que VP8d-Bov es al menos un tercio más pequeña que VP8*, presentando extremos amino y carboxi-terminales más cortos (Lentz et al., 2011). Sin embargo, la fusión por el extremo C-terminal de VP8d-Bov a BLS no fue para nada inestabilizante en el estroma del cloroplasto. Pese a que no pudo establecerse con certeza el plegamiento correcto de la fusión en hojas frescas y liofilizadas, la formación de los decámeros de BLSVP8d-Bov podría llegar a explicar la mayor estabilidad y acumulación.

Dado que los cloroplastos derivan evolutivamente de bacterias, ambos presentan una maquinaria transcripcional y traduccional similar. Aprovechando este hecho, se realizó un análisis preliminar de expresión a partir del vector de transformación en *E. coli*. Sin embargo, este modelo procariontico no proporcionó una buena predicción respecto a la acumulación y estabilidad de BLSVP8d-Bov. Esta proteína se expresó también en muy altos niveles en bacteria pero lo hizo casi exclusivamente en forma de cuerpos de inclusión. VP8* también se había expresado mayoritariamente como cuerpos de inclusión tanto en bacteria como en cloroplastos (Lentz, 2011; Lentz et al., 2011). Llamativamente, y a pesar de los altos niveles de expresión obtenidos, BLSVP8d-Bov siempre se mantuvo soluble en cloroplastos, incluso en hojas senescentes o liofilizadas. La diferencia de solubilidad entre VP8* y BLSVP8d-Bov no pudo ser atribuida exclusivamente a la fusión a BLS debido a que VP8* y VP8d-Bov diferían en longitud de secuencia. No obstante, la naturaleza multimérica de BLS no parece haber ido en detrimento de la solubilidad de la fusión.

El trabajo realizado durante esta tesis también demostró que extractos solubles no purificados obtenidos a partir de hojas transplastómicas frescas o liofilizadas expresando BLSVP8d-Bov indujeron anticuerpos IgY neutralizantes específicos, tal como pudo evidenciarse por ensayos de ELISA y neutralización viral *in vitro*. Una vez más, los niveles de inmunogenicidad y neutralización no pudieron ser comparados directamente con los obtenidos para VP8* debido a la diferencia en longitud entre VP8* y VP8d-Bov (Lentz et al., 2011).

En contraste, la administración de hojas secadas artificialmente fue incapaz de inducir la producción de anticuerpos específicos contra BLSVP8d. Pese al enriquecimiento y la estabilidad observada, se observó una agregación paulatina de la proteína recombinante de manera insoluble, observándose bandas de menor peso y agregados proteicos de tamaños muy superiores. Estos cuerpos de inclusión muy agregados estarían muy desordenados y presumiblemente imposibilitarían generar una respuesta inmune adecuada. Durante el secado al sol existiría entonces una ventana temporal muy acotada (durante la cual BLSVP8d se encontraría en su forma soluble inmunogénica) poco conveniente para utilizar la proteína recombinante en ensayos de inmunización.

La administración oral de suplementos de huevo en polvo conteniendo anticuerpos IgY neutralizantes específicos contra BLSVP8d-Bov podría ser aprovechada en un futuro como una alternativa para conferir protección pasiva contra la infección gastrointestinal por rotavirus. La utilidad de la administración oral de yema de huevo cruda o en polvo o de anticuerpos IgY semi-purificados ya ha sido demostrada para el tratamiento o profilaxis de diversos patógenos entéricos (Carlander et al., 2000; Hatta et al., 1993; Kuroki et al., 1994; Reilly et al., 1997; Sarker et al., 2007; Vega et al., 2011; Vega et al., 2012). Respecto a otros sistemas de expresión de anticuerpos, la yema de huevo como fuente de IgY representa entonces una alternativa de bajo costo fácilmente escalable y no invasiva para la producción de grandes cantidades de anticuerpos policlonales para inmunización pasiva. Entre otras ventajas se encuentra la facilidad de purificación de las IgY (ya que son el único tipo de anticuerpo en yema) y su incapacidad para activar el complemento en mamíferos o unirse a proteínas A o G (Akita and Nakai, 1993; Schade et al., 2005; Svendsen et al., 1995; Vega et al., 2012).

En esta primera instancia, la plataforma BLS demostró ser una alternativa atractiva y económica para la producción a gran escala de VP8d de rotavirus bovino como antígeno vacunal inyectable, o incluso oral, con inmunogenicidad potencialmente mejorada. La liofilización de hojas transplastómicas sin agregado adicional de compuestos lioprotectores podría ser una alternativa interesante para reducir costos, simplificar el procesamiento, purificación y almacenamiento, permitiendo mejores esquemas de inmunización.

Dado que existen 3 cepas de rotavirus bovino mayoritariamente circulantes en la actualidad (Garaicoechea et al., 2006), solo tendría sentido una vacuna recombinante comercial producida a partir de plantas transplastómicas que expresen las 3 variedades de VP8d fusionadas a BLS. El trabajo realizado durante esta primera etapa apuntó a corroborar la factibilidad de emplear a la proteína BLS como plataforma de expresión en un sistema vegetal.

Teniendo en cuenta los resultados alentadores obtenidos, en una segunda etapa se decidió evaluar distintas estrategias de expresión en plantas de una única proteína VP8d de rotavirus equino (VP8d-Eq) que permitiera conferir inmunidad frente a los serotipos virales más predominantes para el desarrollo posterior de una vacuna recombinante comercial a subunidad (Garaicoechea et al., 2011). A fin de determinar más inequívocamente los efectos de la proteína BLS sobre los niveles de expresión y la inmunogenicidad de los antígenos que forman la fusión se decidió expresar VP8d-Eq tanto sola como fusionada a BLS.

Una vez más, el análisis preliminar de expresión a partir del vector de transformación en *E. coli* fue incapaz de proporcionar una predicción adecuada del comportamiento de los antígenos en el estroma del cloroplasto. Esto no resultó sorprendente ya que si bien los cloroplastos derivan evolutivamente de las bacterias (el citoplasma y periplasma bacteriano son espacios equivalentes al estroma y lumen de los tilacoides, respectivamente, de los cloroplastos) aun así existen diferencias importantes entre los ambientes y maquinaria enzimática del citoplasma bacteriano y el estroma del cloroplasto. Entre las diferencias más notables están la ausencia de todo el aparato fotosintético y la presencia de un entorno más reductor en *E. coli* (Bally et al., 2008). Tanto VP8d-Eq como BLSVP8d-Eq resultaron ser inestables en bacteria y se mostraron extremadamente degradadas. No obstante, pudieron obtenerse con éxito plantas transplastómicas expresando ambas proteínas en el estroma del cloroplasto sin que su integridad se viera afectada (solo se observó una leve proteólisis que dio lugar a una versión minoritaria y levemente más pequeña de ambas proteínas).

El ensayo de *western blot* empleando anticuerpos policlonales contra una mezcla de rotavirus, entre los cuales se encuentra la variante equina H2, permitió demostrar fehacientemente que los anticuerpos generados contra VP8* de rotavirus bovino fueron capaces de cruzar con VP8d-Eq dada la similitud de secuencia entre ambos.

VP8d-Eq y BLSVP8d-Eq se mantuvieron predominantemente en su forma soluble y presentaron niveles de expresión de 1,85 % PST o 54 µg/g TF (VP8d-Eq) y 4,33 % PST o 401 µg/g TF (BLSVP8d-Eq) en hojas maduras. El hecho de que VP8d-Eq fuera soluble por si misma impidió sacar conclusiones respecto a la capacidad solubilizante de BLS. Una vez más, la naturaleza multimérica de BLS no parecería ser un impedimento para alcanzar la solubilidad.

Ambas proteínas mantuvieron la integridad y permanecieron estables y solubles luego de la liofilización del tejido, incluso luego de su almacenamiento durante un mes a

temperatura ambiente. En estos casos la disminución del contenido proteico endógeno y la concentración de las proteínas recombinantes (ambos procesos producto de la liofilización) fueron más evidentes, obteniéndose valores de 2,22 % PST o 585,40 µg/g TL (VP8d-Eq) y 8,68 % PST o 3,86 mg/g TL (BLSVP8d-Eq) para las mismas hojas que se habían cuantificado con anterioridad. Si bien los niveles de expresión no fueron tan drásticos como los observados para BLSVP8d-Bov (equivalentes o superiores a 40% PST o 4,85 mg/g TF) representaron valores más que compatibles económicamente con la producción de antígenos vacunales recombinantes a gran escala. Si en su lugar se hubieran diseñado plantas transgénicas nucleares, se habrían obtenido en todos los casos niveles de expresión presumiblemente uno o más ordenes de magnitud inferiores (Daniell et al., 2001b; Molina et al., 2004). Ninguna de las plantas transplastómicas obtenidas evidenció problemas detectables a nivel del fenotipo y fueron completamente indistinguibles de las plantas no transformadas.

La fusión traduccional a proteínas altamente estables para mejorar los niveles de expresión de otras proteínas menos estables es una estrategia ampliamente utilizada en sistemas de expresión de plantas (Leelavathi and Reddy, 2003; Lentz et al., 2012; Morgenfeld et al., 2014; Morgenfeld et al., 2009; Staub et al., 2000). Resultan de particular interés las fusiones de proteínas estables de manera de que estas conformen la parte N-terminal de la fusión ya que precisamente en esta región se han encontrado determinantes importantes de estabilidad (Apel et al., 2010). Esto constituye una regla general y también se han encontrado casos de proteínas que confieren mayor estabilidad cuando se las fusiona de manera de quedar conformando el extremo C-terminal. Según se desprende del análisis de la acumulación de transcritos, este no parecería ser el caso para BLS. Puesto que se observaron diferencias en los niveles de acumulación de los transcritos de RNA mayoritarios codificantes para ambas proteínas recombinantes, sería más probable que la mayor expresión de BLSVP8d-Eq respecto a VP8d-Eq se deba a una mayor tasa transcripcional y acumulación de RNA mensajero. Como ambos tipos de mensajero comparten las regiones río arriba (la región 5'UTR del gen *psbA*) y río abajo (la región codificante para VP8d-Eq) del inicio de la traducción se presume que la tasa de inicio de la traducción no sería responsable de la diferencia observada en sus niveles de expresión. Por otra parte, la acumulación más rápida de proteína recombinante en hojas jóvenes para VP8d-Eq parecería favorecer la hipótesis de que la fusión a BLS no resultaría especialmente estabilizante. La ausencia del transcripto policistrónico detectada en ambos casos haría suponer un problema de estabilidad de los mismos y no jugaría un papel significativo para explicar la diferencia observada en los niveles de expresión.

Si se considera que la fusión BLSVP8d-Eq está compuesta aproximadamente en un 50% por VP8d-Eq la cantidad obtenida para esta proteína sería equivalente para los dos tipos de plantas transplastómicas. En este caso, la utilidad de fusionar VP8d-Eq a BLS radicaría en su capacidad para incrementar la inmunogenicidad de la fusión como un todo. Al momento de escritura de la presente tesis quedan pendientes los ensayos de neutralización viral que permitan establecer la presencia de anticuerpos neutralizantes contra rotavirus equino y si también en este caso la fusión a BLS aporta una mayor capacidad inmunogénica.

Durante el trabajo de esta tesis pudieron ponerse en evidencia las ventajas de las plantas transplastómicas como sistema de producción de vacunas recombinantes (no glicosiladas) de manera potencialmente costo-efectiva. Los niveles de expresión alcanzados serían en principio compatibles con la producción masiva de los antígenos vacunales (Rybicki, 2009; Rybicki, 2010). Asimismo, la gran estabilidad y concentración de las proteínas recombinantes en hojas liofilizadas permitiría facilitar el almacenamiento, purificación (pudiéndose incluso obviar tal como se demostró), transporte y administración, abaratando aún más los costos.

La estrategia de producción evaluada es integral, ya que no solo contempla la vacunación activa sino que además plantea la inmunización pasiva con anticuerpos IgY anti-rotavirus de fácil obtención y purificación.

Si bien en un principio se vislumbró a las plantas como un sistema extremadamente barato para la producción de vacunas comestibles, con el tiempo se hicieron evidentes las necesidades de contar con procesos previos de purificación y estandarización para lograr una administración controlada y reproducible de la dosis del antígeno (Rybicki, 2010). Los antígenos producidos en cloroplastos de tabaco durante la presente tesis serían susceptibles de ser administrados por vía oral a partir de extractos liofilizados y cuantificados. La pared celular y la membrana de los cloroplastos podrían actuar como bioencapsulantes naturales permitiendo que los antígenos alcancen el tejido linfoide asociado al tubo digestivo para despertar inmunidad a nivel de mucosas, lo cual sería esencial si se considera el mecanismo de acción de rotavirus (Chan and Daniell, 2015). En este sentido, la proteína BLS podría contribuir especialmente a potenciar este tipo de inmunidad (dado que ya se demostró la capacidad que tienen fusiones a la proteína BLS purificadas a partir de *E. coli* para conferir inmunidad luego de administradas por vía oral) (Fragoso et al., 2011; Rosas et al., 2006). Llegado el caso se debería prestar especial atención a los niveles de nicotina y otros alcaloides, los cuales resultan

tóxicos y dificultan la administración oral del tabaco. El tabaco no presenta el riesgo de introducirse accidentalmente en la cadena alimenticia, por lo cual podría evaluarse en un futuro la producción de antígenos recombinantes fusionados a BLS para inmunización oral en las variedades de tabaco con contenido reducido de alcaloides que existen disponibles hoy en día (Liew and Hair-Bejo, 2015). Alternativamente podría evaluarse la posibilidad de expresar estas fusiones con la misma finalidad en plantas transplastómicas de lechuga (Kwon and Daniell, 2015; Lakshmi et al., 2013; Su et al., 2015).

Resulta poco probable que las plantas, a corto plazo, desplacen a otros sistemas más convencionales de producción de proteínas recombinantes, los cuales se encuentran mucho más establecidos, refinados y estandarizados, tanto desde el punto de vista industrial como el de la regulatoria. Sin embargo, aún existe lugar para los sistemas basados en plantas, los cuales pueden resultar más convenientes en situaciones determinadas (Stoger et al., 2014). Hoy día se cuenta con varios productos recombinantes comerciales producidos en plantas en el mercado (entre los cuales se encuentra una vacuna veterinaria), números antígenos vacunales en fases clínicas de evaluación y cada vez más cantidad de plantas capaces de producir compuestos recombinantes siguiendo buenas prácticas de manufactura. Siendo este el contexto actual, y teniendo en cuenta la regulatoria más laxa en el caso de antígenos de uso veterinario, no se vislumbra tan remota la posibilidad de generar una vacuna comercial contra rotavirus equino, aprovechando las propiedades potencialmente inmunogénicas de BLS.

Durante los últimos tiempos, y por cuestiones de percepción pública, bioseguridad y regulatoria, surgió una tendencia a evitar el uso de marcadores de selección basados en la resistencia a antibióticos durante la transgénesis vegetal. Esta estrategia es deseable para facilitar la regulatoria de las plantas generadas ya que de este modo se evitan los riesgos hipotéticos de transferencia horizontal de los genes resistencia hacia las bacterias. En la actualidad existen varias alternativas mejor ponderadas basadas en la remoción de los genes de resistencia a antibiótico una vez generadas las plantas o en el uso de otros tipos de marcadores de resistencia entre los cuales se encuentran los que derivan de plantas (Breyer et al., 2014).

Teniendo todo esto en cuenta, en la última instancia de tesis se pretendió emplear el gen de flavodoxina para otorgar tolerancia frente a algún tipo de estrés ambiental. Este gen no solamente deriva de un organismo fotosintético evolutivamente relacionado a las plantas vasculares (*Anabaena sp*) sino que además está desprovisto de regulación en plantas y codifica

una proteína isofuncional a la ferredoxina endógena cuyo mecanismo de acción está ampliamente caracterizado. Además, este gen no presentaría un riesgo a la salud humana ya que está presente en especies de algas consumo humano. Más importantemente, además de constituir un selector interesante el gen de flavodoxina sería de sumo interés agronómico. Su inclusión durante la generación de una planta transplastómica podría además permitir a las plantas resistir a una amplia variedad de estreses de manera sencilla y simultánea, sin producir efectos fenotípicos adversos, incrementando así los rendimientos económicos (Zurbriggen et al., 2010; Zurbriggen et al., 2008).

La expresión del gen de flavodoxina ya había demostrado ser responsable de una mayor tolerancia a distintos tipos de estrés biótico y abiótico en plantas. Particularmente ya se encontraba descrita la resistencia conferida por este gen a varios tipos de adversidades ambientales que derivan en estrés oxidativo (Tognetti et al., 2007a; Tognetti et al., 2006; Tognetti et al., 2007b; Zurbriggen et al., 2009; Zurbriggen et al., 2008). Pese a que diferentes tipos de estrés presentan diversos mecanismos de acción a nivel molecular, muchos convergen en la perturbación de la cadena de transporte de electrones fotosintética y la formación de especies reactivas de oxígeno causando daños importantes a nivel celular. Entre estos tipos de estrés se encuentran el estrés salino y el generado por metil viológeno (compuesto propagador de superóxidos) (Tognetti et al., 2006; Zurbriggen et al., 2007; Zurbriggen et al., 2008). Por lo tanto, en una primera aproximación se realizaron experimentos de regeneración de explantos de tabaco no transformados bajo condiciones estándar de laboratorio y bajo la influencia adicional de estrés oxidativo ocasionado por exposición al herbicida metil viológeno. La acción de este compuesto demostró ser demasiado drástica para ser empleado en un esquema de selección habitual. Adicionalmente, debido a problemas de diseño experimental, se encontraron dificultades para garantizar una exposición homogénea al agente oxidante, cualidad necesaria si se quiere emplear este compuesto como agente selector. Por más que se experimentó con formas menos drásticas que la infiltración por vacío para permitir la permeabilización del metil viológeno al tejido, en todos los casos se vio que la manipulación adicional de los explantos por sí misma para exponerlos al estrés se tradujo en una baja sustancial de la eficiencia de la regeneración. Esta disminución en los niveles de regeneración respecto a los controles no sometidos al tratamiento, ya sea porque el metil viológeno se encontrara presente o no, se puso en evidencia poco tiempo después de colocar los explantos en el medio de regeneración y constituyó una característica indeseada. Por todo esto y como además el metil viológeno es un compuesto altamente tóxico, se centraron los esfuerzos en selección por estrés salino ocasionado por cloruro de sodio, el cual a diferencia del metil

viológeno no genera efectos deletéreos de manera tan brusca y es un compuesto inocuo, barato, de fácil acceso cuyo uso simplifica los protocolos utilizados en el laboratorio.

En el caso de la sal se realizaron curvas de regeneración en paralelo con plantas *wild-type* y con plantas heteroplásticas expresando FLD. Algunas plantas empleadas, al no contener el transgén en todas las copias del ADN del cloroplasto, presentaron un fenotipo heteroplástico característico (Ahlert et al., 2003).

Si bien pudo determinarse con éxito que a concentraciones alrededor de 150 mM o mayores de cloruro de sodio los explantos no transformados fueron incapaces de regenerar y murieron, a esta concentración los explantos expresando el gen de flavodoxina solo pudieron regenerar en forma de callo y no dieron lugar a brotes discretos. La sal afectó, por algún mecanismo desconocido, al proceso de regeneración. Esta hipótesis resultó avalada por el hecho de que en ausencia de sal los controles con explantos que expresaban flavodoxina pudieron regenerar tan eficientemente como los explantos *wild-type*.

Alternativamente, se intentó disminuir la concentración de sal empleada durante la selección, pero la aparición de brotes en los explantos no transformados implicó un compromiso entre la cantidad de brotes *wild-type* y brotes verdaderamente resistentes generados a partir de los callos en los explantos expresando flavoxodina.

La regeneración de brotes a partir de explantos de *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana es un proceso rutinario puesto a punto que no presenta mayores complicaciones en condiciones normales de laboratorio. Esfuerzos adicionales para intentar compatibilizar este proceso con la presencia de sal hubieran implicado una nueva y exhaustiva puesta a punto de las condiciones de regeneración de los explantos, el cual no resultaba ser uno de los objetivos de la presente tesis. De manera adicional, podría haberse experimentado con otras sales similares como el cloruro de potasio o incluso con otros agentes estresantes.

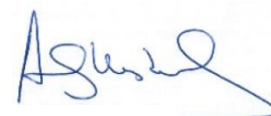
Recientemente en colaboración con el Dr. Néstor Carrillo (IBR, Rosario) se observó que las plantas transgénicas que expresaban flavodoxina nivel nuclear y dirigida a cloroplasto fueron más resistentes a estrés de tipo biótico y abiótico, de manera dosis dependiente (Tognetti et al., 2007a; Zurbriggen et al., 2008). Sin embargo, cuando los niveles de expresión de flavodoxina fueron más altos que los niveles de ferredoxina endógena (situación que ocurrió en el caso de las plantas transplastómicas), estos se tornaron perjudiciales para el bienestar de la planta. Es decir que la mejoría de los parámetros sintéticos y la tolerancia a estrés (particularmente al ocasionado por metil vilógeno) siguieron una curva de tipo

campana, mostrando primero un incremento dosis dependiente para luego, a concentraciones más altas de FLD, caer a niveles similares a los de plantas *wild-type* (Ceccoli et al., 2012; Lodeyro et al., 2012). Estos nuevos resultados nos hicieron pensar en que el gen de flavodoxina, al igual que los que confieren resistencia a herbicidas, se comporta como un selector secundario (o recesivo) y no resulta adecuado para conferir resistencia si solo unas pocas copias del ADN plastídico resultan transformadas en primera instancia. Por lo tanto, la selección primaria con este gen solo sería posible si la segregación al azar produce un plástido que lo contenga en suficientes cantidad de copias como para soportar la letalidad del estrés, lo cual es un evento raro y disminuye marcadamente la eficiencia de aparición de transformantes. En contraste, el gen *aada* constituye un marcador principal (o dominante) ya que al estar presente en pocas copias es capaz de inactivar los antibióticos del medio (Breyer et al., 2014; Day and Goldschmidt-Clermont, 2011). Estos resultados más las dificultades comentadas con anterioridad nos hicieron pensar que sería muy difícil y poco probable encontrar las condiciones para utilizar flavodoxina como gen selector primario. Su utilización sería más beneficiosa en una etapa de selección secundaria con el fin de remover el gen *aada* de las plantas transplastómicas generadas.

Lic. Edgardo Federico Alfano

Dr. Fernando Bravo-Almonacid

Director



Dr. Andrés Wigdorovitz

Co-director

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

Cepas bacterianas.

Se utilizó la cepa DH10B de *Escherichia coli*. Los cultivos líquidos crecieron a 37 °C 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 °C 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 volumen 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 xg 15 min a 4 °C. 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 volumen a un microtubo de 1,5 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.

Aislamientos virales.

El rotavirus bovino fue preparado por la Dra. Marina Mozgovej en el laboratorio del Dr. Andrés Wigdorovitz (Instituto de Virología, INTA-Castelar) y corresponde a la cepa C486 G6P[1].

El rotavirus Equino fue preparado por el Dr. Demian Bellido en el laboratorio del Dr. Andrés Wigdorovitz (Instituto de Virología, INTA-Castelar) y corresponde a la cepa H2 G3P[12].

Plásmidos.

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

-pBSW-utr: Vector de transformación de cloroplastos (Wirth et al., 2006).

-pBSW-utr/FLD: Vector de transformación de cloroplastos, conteniendo la secuencia del gen Flavodoxina (Blanco et al., 2011).

-pET-BLS-VP8d: Construcción utilizada para obtener la secuencia de la fusión BLSVP8d Bovina (Bellido et al., 2009). La misma contiene la secuencia del *core* de VP8 (desde el nucleótido 184 al 672 del gen de VP4) fusionada río arriba a la secuencia de lumazina sintasa de *Brucella* spp.

-pBSW-utr/VP8*: Vector de transformación de cloroplastos, conteniendo la secuencia del antígeno de rotavirus bovino VP8*. (Lentz et al., 2011), utilizado como control positivo en ensayos de *Western Blot*.

Secuencias

-BLSVP8d-Bov: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la fusión BLSVP8d-Bov. La quimera consiste del *core* de VP8 (desde el nucleótido 184 al 672 del gen de VP4 de Rotavirus bovino) fusionado mediante el pentapéptido GSGSG al extremo N-terminal de la enzima lumazina sintasa de *Brucella* spp. Se muestran subrayados en la secuencia nucleotídica los sitios NdeI (CATATG) y XbaI (TCTAGA), utilizados en el subclonado y los codones de iniciación y fin de la traducción (en negrita). Se indica en la secuencia aminoacídica los residuos correspondientes al *linker* (subrayado y sombreado). Además se señalan sombreados cambios en la secuencia nucleotídica utilizada en la construcción respecto a la secuencia teórica de VP8. De la misma manera se indican sombreados los cambios aminoacídicos correspondientes.

```

0001  CATATGCATGAACCAAGTGGCTTGATGGACCATATCAACCAACGACTTTTAATCCACCTGTA
0001  M H E P V L D G P Y Q P T T F N P P V
0061  AGTTATTGGATGTTGTTAGCACCAACGAACGCGGGGGTGGTAGATCAAGGTACGAACAAT
0020  S Y W M L L A P T N A G V V D Q G T N N
0121  ACAAACAGATGGTTAGCGACAATATTAATTCAACCAAATGTACAGCAAGTTGAGCGAACA
0040  T N R W L A T I L I K P N V Q Q V E R T
0181  TATACATTATTTGGGCAACAAGTTCAAGTAACAGTATCAAATGATTCACAGACAAAGTGG
0060  Y T L F G Q Q V Q V T V S N D S Q T K W
0241  AAGTTTGTGGATCTAAGTAAGCAGACACAAGATGGTAATTATTTCACAACACGGTCCCTCTA

```

```

0080   K F V D L S K Q T Q D G N Y S Q H G P L
0301   CTGTCAACACCGAAACTGTATGGAGTGATGAAACATGGAGGTAAAATTTACACTTATAAT
0100   L S T P K L Y G V M K H G G K I Y T Y N
0361   GGAGAGACACCGAACGCAACTACTGGTTACTACTCTACAACAACTTTTGACACTGTAAAC
0120   G E T P N A T T G Y Y S T T N F D T V N
0421   ATGACAGCATATTGGGATTTTTATATAATTCCATTAGCACAAAGAAGCAAAATGCACTGAA
0140   M T A Y C D F Y I I P L A Q E A K C T E
0481   TACATAAATAATGGATTAGGTTCTGGTCTTAAGACATCCTTTAAATCGCATTC
0160   Y I N N G L G S G S G L K T S F K I A F
0541   ATTCAGGCCCGCTGGCAGCGCCGACATCGTTGACGAAGCGCGCAAAAGCTTTGTTCGCCGAA
0180   I Q A R W H A D I V D E A R K S F V A E
0601   CTGGCCGCAAAGACGGGTGGCAGCGTCGAGGTAGAGATATTCGACGTGCCGGGTGCATAT
0200   L A A K T G G S V E V E I F D V P G A Y
0661   GAAATTCCTTCCACGCCAAGACATTGGCCAGAACCAGGCGCTATGCAGCCATCGTCGGT
0220   E I P L H A K T L A R T G R Y A A I V G
0721   GCGGCCTTCGTGATCGACGGCGGCATCTATCGTCATGATTTTCGTGGCGACGGCCGTTATC
0240   A A F V I D G G I Y R H D F V A T A V I
0781   AACGGCATGATGCAGGTGCAGCTTGAAACGGAAGTGCCGGTGCTGAGCGTCGTGCTGACG
0260   N G M M Q V Q L E T E V P V L S V V L T
0841   CCGCACCATTTCCATGAAAGCAAGGAGCATCACGACTTCTTCCATGCTCATTTCAAGGTG
0280   P H H F H E S K E H H D F F H A H F K V
0901   AAGGGCGTGGAAGCGGCCCATGCCGCTTGAGATCGTGAGCGAGCGCAGCCGCATCGCG
0300   K G V E A A H A A L Q I V S E R S R I A
0961   CTTGTCTGATCTAGAGGATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGA
0320   L V *

```

966 nucleótidos, 321 aminoácidos, 35,5 kDa.

-VP8d-Eq: Secuencia nucleotídica y aminoacídica del antígeno de Rotavirus equino VP8d (desde el aminoácido 62 al 224 de la proteína VP4). Se muestran subrayados en la secuencia nucleotídica los sitios NdeI (CATATG), XbaI (TCTAGA) y Bsp1286I (GGGCTC), utilizados en el subclonado y los codones de iniciación y fin de la traducción (en negrita). Además se indican sombreados en la secuencia nucleotídica cambios sinónimos a fin de eliminar o introducir sitios de restricción.

```

0001   CATATGGAACCAGTACTAGATGGTCCATAACCAACCAACTAAGTTTAATCCACCAGTGAAT
0001   M E P V L D G P Y Q P T K F N P P V N
0061   TATTGGATGCTACTATCTCCTTTAAACGCTGGTGTGGTGAAGGAACAAATAGTATT
0020   Y W M L L S P L N A G V V V E G T N S I
0121   GATCGCTGGTTAGCAACTATTTTAATAGAACCAAAACGTTACAACAACACTACCAGAACATAC
0040   D R W L A T I L I E P N V T T T T R T Y
0181   ACATTATTTGGAGTGCAAGAGCAGATATCAGTAGAAAACAATTCAACTACAAAATGGAAA
0060   T L F G V Q E Q I S V E N N S T T K W K
0241   TTTATAAATTTAATTAATACTACTCTATCGGGCAGTTTTTCATTATATTCTACTCTACTA
0080   F I N L I K T T L S G S F S L Y S T L L
0301   TCAGAACCAAAATTACATGGAATTATGAAACATGGTGGACAGCTATGGGTTTATAATGGA
0100   S E P K L H G I M K H G G Q L W V Y N G
0361   GAAACTCCAAATGCCACTACTACGGGCTACGTAACCTCAAATTATGATGCACTTACTATG
0120   E T P N A T T T G Y V T S N Y D A L T M
0421   ACATCCTTTTGTGATTTTTATATAATTCCTAGAAATCAAGAGTCAACATGTACAGAATAT
0140   T S F C D F Y I I P R N Q E S T C T E Y
0481   ATTAATAATGGGCTTAATCTAGA
0160   I N N G L *

```

495 nucleótidos; 164 aminoácidos; 18.4 kDa.

-BLSVP8d-Eq: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la fusión BLSVP8d-Eq. La quimera consiste del *core* de VP8 (desde el aminoácido 62 al 224 de la proteína VP4 de Rotavirus

equino) fusionado mediante el pentapéptido GSGSG al extremo N-terminal de la enzima lumazina sintasa de *Brucella* spp. Se muestran subrayados en la secuencia nucleotídica los sitios NdeI (CATATG), XbaI (TCTAGA) y Bsp1286I (GGGCTC) utilizados en el subclonado y los codones de iniciación y fin de la traducción (en negrita). Se indican en la secuencia aminoacídica los residuos correspondientes al *linker* (sombreado). Además se indican sombreados en la secuencia nucleotídica cambios sinónimos a fin de eliminar o introducir sitios de restricción.

```

0001  CATATGGAACCAGTACTAGATGGTCCATACCAACCAACTAAGTTTAATCCACCAGTGAAT
0001      M E P V L D G P Y Q P T K F N P P V N
0061  TATTGGATGCTACTATCTCCTTTAAACGCTGGTGTGTGGTTGAAGGAACAAATAGTATT
0020      Y W M L L S P L N A G V V V E G T N S I
0121  GATCGCTGGTTAGCAACTATTTTAATAGAACCAACGTTACAACAACCTACCAGAACATAC
0040      D R W L A T I L I E P N V T T T T R T Y
0181  ACATTATTTGGAGTGCAAGAGCAGATATCAGTAGAAAACAATTCAACTACAAAATGGAAA
0060      T L F G V Q E Q I S V E N N S T T K W K
0241  TTTATAAATTTAATTTAAACTACTCTATCGGGCAGTTTTTCATTATATTCTACTCTACTA
0080      F I N L I K T T L S G S F S L Y S T L L
0301  TCAGAACCAAAATTACATGGAATTATGAAACATGGTGGACAGCTATGGGTTTATAATGGA
0100      S E P K L H G I M K H G G Q L W V Y N G
0361  GAAACTCCAAATGCCACTACTACGGGCTACGTAACCTCAAATTATGATGCACTTACTATG
0120      E T P N A T T T G Y V T S N Y D A L T M
0421  ACATCCTTTTGTGATTTTTATATAATTCCTAGAAATCAAGAGTCAACATGTACAGAATAT
0140      T S F C D F Y I I P R N Q E S T C T E Y
0481  ATTAATAATGGGCTCGGTTCTGGTTCTGGTCTTAAGACATCCTTTAAAATCGCATTCATT
0160      I N N G L G S G S G L K T S F K I A F I
0541  CAGGCCCGCTGGCACGCCGACATCGTTGACGAAGCGCGCAAAAGCTTTGTGCGCCGAACG
0180      Q A R W H A D I V D E A R K S F V A E L
0601  GCCGCAAAGACGGGTGGCAGCGTTCGAGGTAGAGATATTCGACGTGCCGGGTGCATATGAA
0200      A A K T G G S V E I F D V P G A Y E
0661  ATTCCCCTTACGCCAAGCATTGGCCAGAACCAGGCGCTATGCAGCCATCGTTCGGTGGC
0220      I P L H A K T L A R T G R Y A A I V G A
0721  GCCTTCGTGATCGACGGCGGCATCTATCGTCATGATTTTCGTGGCGACGGCCGTTATCAAC
0240      A F V I D G G I Y R H D F V A T A V I N
0781  GGCATGATGCAGGTGCAGCTTGAAACGGAAGTGCCGGTGCTGAGCGTCTGCTGACGCCG
0260      G M M Q V Q L E T E V P V L S V V L T P
0841  CACCATTTCCATGAAAGCAAGGAGCATCACGACTTCTTCCATGCTCATTTCAGGTGAAG
0280      H H F H E S K E H H D F F H A H F K V K
0901  GCGTGGAAGCGGCCCATGCCGCTTGCAGATCGTGAGCGAGCGCAGCCGCATCGCGCTT
0300      G V E A A H A A L Q I V S E R S R I A L
0961  GTCTGATCTAGAGGATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGA
0320      V *

```

963 nucleótidos; 320 aminoácidos; 35,4 kDa.

-FLD: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de flavodoxina de *Anabaena* sp.

```

0001  CATATGTCAAAGAAAATTGGTTTATTCTACGGTACTCAAACCTGGTAAAACCTGAATCAGTA
0001      M S K K I G L F Y G T Q T G K T E S V
0061  GCAGAAATCATTCGAGACGAGTTTTGGTAATGATGTGGTGACATTACACGATGTTCCCAG
0020      A E I I R D E F G N D V V T L H D V S Q
0121  GCAGAAGTAACTGACTTGAATGATTATCAATATTTGATTATTGGCTGTCTACTTGGAAAT
0040      A E V T D L N D Y Q Y L I I G C P T W N
0181  ATTGGCGAACTGCAAAGCGATTGGGAAGGACTCTATTCAGAACTGGATGATGTAGATTTT
0060      I G E L Q S D W E G L Y S E L D D V D F
0241  AATGGTAAATTTGGTTGCCTACTTTGGGACTGGTGACCAAATAGGTTACGCAGATAAATTT
0080      N G K L V A Y F G T G D Q I G Y A D N F
0301  CAGGATGCGATCGGTATTTTGAAGAAAAAATTTCTCAACGTGGTGGTAAAACCTGTCGGC

```

```

0100   Q D A I G I L E E K I S Q R G G K T V G
0361   TATTGGTCAACTGATGGATATGATTTTAATGATTCCAAGGCACTAAGAAATGGCAAGTTT
0120   Y W S T D G Y D F N D S K A L R N G K F
0421   GTAGGACTAGCTCTTGATGAAGATAATCAATCTGACTTAACAGACGATCGCATCAAAAAGT
0140   V G L A L D E D N Q S D L T D D R I K S
0481   TGGGTTGCTCAATTAAAGTCTGAATTTGGTTTGTAACTCTAGA
0160   W V A Q L K S E F G L *

```

513 nucleótidos; 170 aminoácidos; 19 kDa.

Olignucleótidos iniciadores:

Cloro fw: 5' GTATCTGGGGAATAAGCATCGG 3'

Cloro rv: 5' CGATGACGCCAACTACCTCTG 3'

NdeI5' BLSVP8d-Bov: 5' CCCATATGCATGAACCAGTGCTTG 3'

XbaI3' BLSVP8d-Bov: 5' CCTCTAGATCAGACAAGCGCGATGC 3'

Bsp1286I5' BLS: 5' AAGGGCTCGGTTCTGGTTCTGGTC 3'

Se indican subrayados los sitios de restricción incorporados en los oligonucleótidos.

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 xg (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 destilada. 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.

Desfosforilación de extremos compatibles

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

Transformación genética de cloroplastos de plantas de tabaco.

Se realizó la transformación por biobalística según el método descrito por Svab y Maliga (Svab and Maliga, 1993), utilizando el sistema PDS-1000 / He Particle Delivery System (BIO-RAD) y el vector de transformación de cloroplastos pBSW-utr (Wirth et al., 2006). El protocolo incluyó la preparación y recubrimiento con ADN de las micropartículas de oro, el bombardeo de las hojas, la selección de los 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 (Lutz et al., 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 CaCl₂ 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 (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana) 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 fotoperiodo 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 and 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 fotoperiodo 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 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. 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.

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

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

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 μ l 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 μ l 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 xg (4 °C), y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó 1 μ l 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 xg. El precipitado se lavó con etanol 80% (v/v), se dejó secar, y se resuspendió en 25 μ l de agua.

La reacción de PCR se realizó con 1 μ l 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 et al., 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 MgCl₂.

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 vórtex. Se centrifugó 10 min a 5.000 xg (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 μ g/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 xg. 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 μ g de ADN total con 10-20 unidades de la correspondiente enzima 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 cortado 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 plásticos *trnI* y *trnA*, se obtuvo a partir del plásmido pBS16S-23S (Segretin, 2009) por corte con las enzimas BamHI y BglII. 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 vórtex vigorosamente, y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 15 min a 15.000 xg (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 xg 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 μ l de agua.

Se utilizaron entre 5 y 10 μ g 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 μ g/ml y buffer de siembra 10X (glicerol 50% [v/v], azul de bromofenol 0,25% [m/v], EDTA-Na₂ 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 descritos anteriormente para el ensayo de *Southern blot*. Como molde para las sondas utilizadas en los ensayos de *northern blot*, se utilizó el fragmento obtenido por restricción con las enzimas NdeI y XbaI de la construcción pZErO-2/VP8d-Eq y el fragmento obtenido por PCR a partir de la construcción pZErO-2/BLSVP8d-Bov empleando los oligonucleótidos iniciadores BLS fw y BLSVP8d-Bov rev.

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 hojas en un microtubo y se agregaron 125 µl de buffer Laemmli (Laemmli, 1970). Se calentó la muestra 10 min a 100 °C, y se centrifugó 10 min a 15.000 xg. 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 Laemmli, y se sembraron 10 µl del extracto.

Análisis de la solubilidad de BLSVP8d-Bov en E. coli

Se centrifugó 1 ml de cultivo de *E. coli* transformada con los respectivos vectores pBSW-utr. Se agregó lisozima en una concentración 2 mg/ml en buffer (0,1 M NaCl, 10 mM Tris pH: 8, 1 mM EDTA, 5% Tritón X-100) y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. 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) y se centrifugó 15 min a 10.000 xg (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 Laemmli para sembrar en geles SDS-PAGE.

Análisis de la solubilidad de BLSVP8d-Bov, BLSVP8d-Eq y VP8d-Eq en plantas transplastómicas

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 sonicó 3 veces por 15 s con el sistema Heat System-Ultrasonic (50% ciclo, potencia 5) y se centrifugó 15 min a 10.000 xg (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 Laemmli para sembrar en geles SDS-PAGE proteínas provenientes de 4 mg de tejido fresco inicial.

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. Los geles fueron corridos 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 (Sambrook et al., 1989). La tinción con Coomassie Brilliant Blue se realizó incubando los geles en agitación durante toda la noche en solución de teñido (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,05% [m/v], metanol 40% [v/v], ácido acético 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 (4 °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], leche descremada en polvo 5% [m/v] y Tween-20 0,05% [v/v]). La inmunodetección se realizó incubando 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 anticuerpos anti-IgG de ratón o conejo según el caso, marcados 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'-difeníl-3,3'[3,3'-dimetoxi-4,4'-difeníl]-ditetrazolium) 0,3 mg/ml y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato) 0,15 mg/ml, hasta la aparición de las bandas. El revelado se frenó descartando la solución de revelado y lavando las membranas en agua.

Alternativamente, para la inmunodetección se emplearon anticuerpos secundarios anti-IgG de caballo marcados con peroxidasa de rábano diluidos 1:1000 solución de bloqueo. Se realizaron 3 lavados de 5 min con T-TBS. El revelado se realizó por la técnica de electroquimioluminiscencia (ECL) empleando el kit Bio-Lumina de reactivos quimioluminiscentes (Kalium Technologies) y se registro la luminiscencia a distintos tiempos de exposición empleando un equipo GeneGnome XQR (Syngene).

Los anticuerpos y sueros utilizados se indican a continuación:

- Suero de ratón o conejo contra VP8* de Rotavirus bovino (Mozgovoj, 2008).
- Suero de ratón contra BLS de *Brucella* spp. (Bellido et al., 2009).

- Suero de caballo contra una mezcla de rotavirus equino H2 (G3P[12]), de simio SA11 (G3P[2]) y bovino NCDV-Lincoln (G6P[1]) (Laboratorio de Virus Equinos, Instituto de Virología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria en Castelar).
- Suero de conejo contra Fld de *Anabaena* sp. (Laboratorio del Dr. Néstor Carrillo del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario).

Cuantificación de la acumulación de BLSVP8d-Bov, BLSVP8d-Eq y VP8d-Eq en hojas de plantas transplastómicas por SDS-PAGE.

Se prepararon extractos proteicos totales de las distintas hojas: se maceraron 0,2 g de tejido fresco o 0,05 g de tejido liofilizado en mortero con nitrógeno líquido, se agregó 1 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 30 mM, y se sonicó 3 veces durante 15 s con el sistema Heat System-Ultrasonic. Se centrifugó 15 min a 10.000 xg (4 °C), y se tomó el sobrenadante. Se determinaron las proteínas solubles totales por el método de Bradford (Bradford, 1976), y se sembraron entre 0,5 y 30 µg de los extractos proteicos. En paralelo 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 BLSVP8d-Bov, BLSVP8d-Eq, VP8d-Eq 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 liofilizado (mg/g T).

Secado artificial de las hojas de plantas transplastómicas BLSVP8d-Bov.

Plantas de aproximadamente 3 meses de edad fueron cosechadas, colgadas y secadas a temperatura ambiente. Las plantas fueron mantenidas dentro del invernadero, durante 5 semanas.

Liofilizado de hojas de plantas WT y transplastómicas BLSVP8d-Bov, BLSVP8d-Eq y VP8d-Eq

Las hojas fueron cortadas en fragmentos pequeños de aproximadamente 1 cm de lado. Los fragmentos fueron congelados a -80 °C y posteriormente fueron liofilizados sometiéndolos a un vacío de 0,13 mBar durante al menos 24 hs usando un equipo Freezone Lyph-Lock 6 Freeze Dry System (Labconco). La correcta liofilización se corroboró por comparación del peso de los fragmentos antes y después de la liofilización. Las muestras liofilizadas fueron almacenadas a -80 °C.

Inmunización de gallinas con extractos recombinantes conteniendo BLSVP8d-Bov, BLSVP8d-Eq y VP8d-Eq

Para los ensayos de inmunización se emplearon extractos solubles cuantificados por densitometría (tal como se describe con anterioridad) tanto de hojas frescas como de hojas liofilizadas de plantas WT y transplastómicas. Se inmunizaron grupos de gallinas ponedoras de huevos marrón claro (n=2) seronegativas para rotavirus. Los grupos fueron inoculados con 3,83 µg de BLSVP8d (de los cuales 2 µg correspondieron a VP8d) o 2 µg de VP8d. La cantidad de proteína soluble total de los extractos recombinantes frescos o liofilizados fue normalizada respecto a la cantidad de proteína soluble total en los extractos *wild-type* respectivos. Las gallinas recibieron 3 dosis intramusculares de 0,5 ml (antígeno: adyuvante incompleto de Freund en proporción 50:50) en los días 0, 30 y 75. Se controló que no aparecieran efectos adversos en la capacidad ponedora y los sitios de inyección. Se colectaron huevos en los días 0, 87, 94 y 103 post primera inmunización (DPI).

Las gallinas fueron obtenidas del bioterio del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar. La inmunización, manipulación y colección de muestras fue llevada a cabo por personal entrenado ante la supervisión de un veterinario, de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité de ética y bienestar animal del INTA.

Medición por ELISA de anticuerpos IgY contra BLSVP8d-Bov, BLSVP8d-Eq y VP8d-Eq en yema de huevo.

La purificación a partir de yema de huevo se adaptó de Akita & Nakai (Akita and Nakai, 1993). Se separaron las claras de las yemas, estas últimas fueron diluidas con 5 volúmenes de agua destilada. Las muestras de yema fueron congeladas a -80 °C y descongeladas al día siguiente en hielo. Posteriormente se centrifugaron a 8000 xg durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se almacenó a 4 °C y se utilizó en la determinación subsiguiente de IgY. Los títulos de IgY fueron determinados de acuerdo a Bellido y col (Bellido et al., 2012). Resumidamente, se adsorbió en una placa de 96 pocillos durante toda la noche 1 µg de VP8d purificada por pocillo en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 y se bloqueó con Suero Normal Equino (SNE) 5% en PBS-T por 1 h a 37 °C. Se descartó el buffer de bloqueo y se incubaron diluciones seriadas al cuarto de las muestras de IgY, comenzando en una dilución 1/20, en buffer de bloqueo por 1 h a 37 °C. Luego se lavaron los pocillos con PBS-T y se incubaron con anticuerpos anti-IgY de gallina conjugado a peroxidasa de rábano (Sigma Chemical Co., USA). Luego de un lavado exhaustivo se realizó el revelado con un sistema de ABTS/H₂O₂ y se frenó la reacción por el agregado de SDS 5%. Finalmente se midió la absorbancia a 405 nm, (A₄₀₅) en un equipo Multiskan Ex (Labsystems Inc.). Como valor de corte se estableció la densidad óptica (DO) específica media más 3 desvíos estándar calculada a partir de muestras de IgY purificada obtenida de gallinas inmunizadas con extractos proteicos solubles de plantas *wild-type*. Como control positivo se emplearon anticuerpos IgY, previamente purificados, contra BLSVP8d expresada en E. coli, los cuales cruzan parcialmente con VP8d C486 BRV.

Los títulos se expresaron como la recíproca de la dilución más alta de IgY que presentó un valor de DO superior al valor de corte.

Ensayo de neutralización viral

Los títulos de neutralización viral se determinaron a partir de ensayo de reducción de focos fluorescentes (To et al., 1998). Resumidamente, se mezclaron diluciones seriadas de fracciones IgY filtradas con un volumen igual de cepa de rotavirus Bovino de manera de tener 100 unidades formadoras de foco fluorescente (UFF) cada 100 μ L de mezcla y se incubaron por 1 h a 37 °C. Seguidamente se usó esta mezcla para inocular una monocapa (por cuadruplicado) y se incubó por 48 h a 37 °C. Las placas fueron fijadas posteriormente con acetona 70% y el ensayo se reveló usando anticuerpos policlonales anti rotavirus bovino conjugado a isotiocianato de fluoresceína. Este anticuerpo fue obtenido de la hiperinmunización de un ternero deprivado de calostro. Se consideraron como protectivas las muestras que generaron una reducción mayor al 80% de la tasa de infección. El título de neutralización viral se calculó con el método de Reed & Muench considerando la mayor dilución que resultó positiva (Reed and Muench, 1938).

Curvas de regeneración de explantos de *N. tabacum* que expresan el gen flavodoxina de *Anabaena* sp. en presencia de NaCl o Metil Viológeno

Se realizaron curvas de regeneración en presencia de diferentes concentraciones de NaCl o Metil viológeno para evaluar la sensibilidad de explantos foliares de *N. tabacum* cv. Petit Havana a estos compuestos.

Se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 cm de lado a partir de hojas jóvenes de entre 6-8 semanas de plantas de tabaco crecidas *in vitro*. Se colocaron de 6 a 10 fragmentos con la cara abaxial hacia abajo en placas de Petri conteniendo medio de cultivo con hormonas (ácido naftalen-acético 0,1 μ g/ml y bencilaminopurina 1 μ g/ml) que, luego de aproximadamente un mes, permiten la generación de nuevos tallos a partir del tejido. El medio contenía además los agentes causantes de estrés salino (NaCl) u oxidativo (metil viológeno) en diferentes concentraciones. Se pretendió determinar la concentración mínima de los agentes estresantes que impide la regeneración de brotes para cada compuesto. Como situación control, se permitió que los explantos regeneraran en ausencia de estos agentes. Cada experiencia fue realizada por duplicado. Las placas fueron sometidas a un fotoperíodo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad, a una temperatura de 23°C. Se registró periódicamente la capacidad de regeneración de los explantos.

En una primera instancia, previo a la colocación de los explantos en las placas conteniendo el medio de regeneración, se realizó un desafío inicial por estrés oxidativo ocasionado por metil viológeno. Para todos los casos, se preparó una solución stock fresca, la cual fue empleada para realizar exposición a las siguientes concentraciones del agente: 0 / 0,5 / 0,75 / 1 / 1,25 / 1.5 μ M. Se ensayaron distintos tipos de exposición inicial a este agente oxidativo. Se realizó la inmersión de los explantos en una solución conteniendo medio de

cultivo MS concentrado o diluido 1:4 y metil viológeno y se aplicó vacío para forzar su ingreso en el tejido. Alternativamente, en una estrategia menos agresiva, se realizó una inmersión de los explantos en medio de cultivo concentrado o diluido conteniendo el agente estresante sin vacío y durante tiempos más prolongados (21 hs) con agitación suave en oscuridad.

En una segunda instancia, se evaluó la respuesta del tejido frente a estrés salino (cloruro de sodio). Para todos los casos, se preparó una solución stock fresca, la cual fue empleada para realizar exposición a las siguientes concentraciones de sal: 0 / 75 / 150 / 175 / 200 / 250 / 300 mM. La curva se refinó posteriormente hacia los siguientes valores: 0 / 75 / 95 / 115 / 135 / 150 mM.

En el caso del cloruro de sodio, además de plantas de tabaco sin transformar (*wild-type*), también se analizó en paralelo la regeneración de explantos provenientes de plantas transformadas a nivel plastídico con el vector pBSW5'UTRFLD portando al gen que codifica la proteína flavodoxina. Se usaron plantas recientemente transformadas ya que las mismas no contaban con todas las copias de genoma de cloroplasto con el transgén integrado (heteroplásticas), situación similar a la de brotes recientemente regenerados en un esquema de selección por estrés abiótico.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Ahlert, D., Ruf, S. and Bock, R. (2003) Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15730-15735.
- Akita, E.M. and Nakai, S. (1993) Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain. *J Immunol Methods* **160**, 207-214.
- Andrianova, E.P., Kremetsugskaia, S.R., Lugovskaia, N.N., Mayorova, T.K., Borisov, V.V., Eldarov, M.A., Ravin, N.V., Folimonov, A.S. and Skryabin, K.G. (2011) Foot and mouth disease virus polyepitope protein produced in bacteria and plants induces protective immunity in guinea pigs. *Biochemistry (Mosc)* **76**, 339-346.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 373-399.
- Apel, W., Schulze, W.X. and Bock, R. (2010) Identification of protein stability determinants in chloroplasts. *Plant J* **63**, 636-650.
- Ayliffe, M.A., Scott, N.S. and Timmis, J.N. (1998) Analysis of plastid DNA-like sequences within the nuclear genomes of higher plants. *Mol Biol Evol* **15**, 738-745.
- Babbs, C.F., Pham, J.A. and Coolbaugh, R.C. (1989) Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol* **90**, 1267-1270.
- Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Sch, xfc, rmann, P. and Buchanan, B.B. (2003) Proteomics Gives Insight into the Regulatory Function of Chloroplast Thioredoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 370-375.
- Bally, J., Paget, E., Droux, M., Job, C., Job, D. and Dubald, M. (2008) Both the stroma and thylakoid lumen of tobacco chloroplasts are competent for the formation of disulphide bonds in recombinant proteins. *Plant Biotechnology Journal* **6**, 46-61.
- Barrandeguy, M., Parreno, V., Lagos Marmol, M., Pont Lezica, F., Rivas, C., Valle, C. and Fernandez, F. (1998) Prevention of rotavirus diarrhoea in foals by parenteral vaccination of the mares: field trial. *Dev Biol Stand* **92**, 253-257.
- Bellido, D., Craig, P.O., Mozgovej, M.V., Gonzalez, D.D., Wigdorovitz, A., Goldbaum, F.A. and Dus Santos, M.J. (2009) Brucella spp. lumazine synthase as a bovine rotavirus antigen delivery system. *Vaccine* **27**, 136-145.
- Bellido, D., Chacana, P., Mozgovej, M., Gonzalez, D., Goldbaum, F., Wigdorovitz, A. and Santos, M.J.D. (2012) Brucella spp. Lumazine synthase as a novel immunomodulator to produce egg yolk antibodies. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **03**, 80-86.
- Berguer, P.M., Mundinano, J., Piazzon, I. and Goldbaum, F.A. (2006) A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4. *J Immunol* **176**, 2366-2372.
- Blanco, N.E., Ceccoli, R.D., Segretin, M.E., Poli, H.O., Voss, I., Melzer, M., Bravo-Almonacid, F.F., Scheibe, R., Hajirezaei, M.R. and Carrillo, N. (2011) Cyanobacterial flavodoxin complements ferredoxin deficiency in knocked-down transgenic tobacco plants. *Plant J* **65**, 922-935.
- Bock, R. (2001) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol* **312**, 425-438.
- Bock, R. (2007) Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 100-106.
- Bock, R. (2015) Engineering Plastid Genomes: Methods, Tools, and Applications in Basic Research and Biotechnology. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 211-241.
- Bock, R. and Khan, M.S. (2004) Taming plastids for a green future. *Trends Biotechnol* **22**, 311-318.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Breyer, D., Kopertekh, L. and Reheul, D. (2014) Alternatives to Antibiotic Resistance Marker Genes for In Vitro Selection of Genetically Modified Plants – Scientific Developments, Current Use, Operational Access and Biosafety Considerations. *Critical Reviews in Plant Sciences* **33**, 286-330.
- Cardinau, G., Mason, H., Van Eck, J., Kirk, D. and Walmsley, A. (2004) Vectors and cells for preparing immunoprotective compositions derived from transgenic plants. World Patent Application. WO 2004/098533.
- Carlander, D., Kollberg, H., Wejaker, P.E. and Larsson, A. (2000) Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol Res* **21**, 1-6.

- Carrillo, N. and Ceccarelli, E.A. (2003) Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism. *European Journal of Biochemistry* **270**, 1900-1915.
- Castanon, S., Marin, M.S., Martin-Alonso, J.M., Boga, J.A., Casais, R., Humara, J.M., Ordas, R.J. and Parra, F. (1999) Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* **73**, 4452-4455.
- Ceccoli, R., Blanco, N., Medina, M. and Carrillo, N. (2011) Stress response of transgenic tobacco plants expressing a cyanobacterial ferredoxin in chloroplasts. *Plant Mol Biol* **76**, 535-544.
- Ceccoli, R., Blanco, N., Segretin, M., Melzer, M., Hanke, G., Scheibe, R., Hajirezaei, M.-R., Bravo-Almonacid, F. and Carrillo, N. (2012) Flavodoxin displays dose-dependent effects on photosynthesis and stress tolerance when expressed in transgenic tobacco plants. *Planta* **236**, 1447-1458.
- Ceccherini, M., Pote, J., Kay, E., Van, V.T., Marechal, J., Pietramellara, G., Nannipieri, P., Vogel, T.M. and Simonet, P. (2003) Degradation and transformability of DNA from transgenic leaves. *Appl Environ Microbiol* **69**, 673-678.
- Craig, P.O., Berguer, P.M., Ainciart, N., Zylberman, V., Thomas, M.G., Martinez Tosar, L.J., Bulloj, A., Boccaccio, G.L. and Goldbaum, F.A. (2005) Multiple display of a protein domain on a bacterial polymeric scaffold. *Proteins* **61**, 1089-1100.
- Crawford, S.E., Labbe, M., Cohen, J., Burroughs, M.H., Zhou, Y.J. and Estes, M.K. (1994) Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol* **68**, 5945-5952.
- Chan, H.-T. and Daniell, H. (2015) Plant-made oral vaccines against human infectious diseases-Are we there yet? *Plant Biotechnology Journal* **13**, 1056-1070.
- Chen, T.H., Hu, C.C., Liao, J.T., Lee, C.W., Liao, J.W., Lin, M.Y., Liu, H.J., Wang, M.Y., Lin, N.S. and Hsu, Y.H. (2012) Induction of protective immunity in chickens immunized with plant-made chimeric Bamboo mosaic virus particles expressing very virulent Infectious bursal disease virus antigen. *Virus Res* **166**, 109-115.
- D'Aoust, M.A., Couture, M.M., Charland, N., Trepanier, S., Landry, N., Ors, F. and Vezina, L.P. (2010) The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol J* **8**, 607-619.
- Daniell, H. (2007) Transgene containment by maternal inheritance: effective or elusive? *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6879-6880.
- Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S. and Lee, S.-B. (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat Biotech* **16**, 345-348.
- Daniell, H., Khan, M.S. and Allison, L. (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci* **7**, 84-91.
- Daniell, H., Lee, S.B., Panchal, T. and Wiebe, P.O. (2001a) Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol* **311**, 1001-1009.
- Daniell, H., Singh, N.D., Mason, H. and Streatfield, S.J. (2009) Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci* **14**, 669-679.
- Daniell, H., Streatfield, S.J. and Wycoff, K. (2001b) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* **6**, 219-226.
- Day, A. and Goldschmidt-Clermont, M. (2011) The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant Biotechnol J* **9**, 540-553.
- De Cosa, B., Moar, W., Lee, S.B., Miller, M. and Daniell, H. (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol* **19**, 71-74.
- Dietz, K.J., Jacob, S., Oelze, M.L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S.M., Baier, M. and Finkemeier, I. (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J Exp Bot* **57**, 1697-1709.
- Dong, J.L., Liang, B.G., Jin, Y.S., Zhang, W.J. and Wang, T. (2005) Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* **339**, 153-163.
- Dormitzer, P.R., Sun, Z.Y., Wagner, G. and Harrison, S.C. (2002) The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J* **21**, 885-897.
- Dufourmantel, N., Dubald, M., Matringe, M., Canard, H., Garcon, F., Job, C., Kay, E., Wisniewski, J.-P., Ferullo, J.-M., Pelissier, B., Sailland, A. and Tissot, G. (2007) Generation and characterization of soybean and marker-free tobacco plastid transformants over-expressing a bacterial 4-

- hydroxyphenylpyruvate dioxygenase which provides strong herbicide tolerance. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 118-133.
- Dus Santos, M.J., Carrillo, C., Ardila, F., Rios, R.D., Franzone, P., Piccone, M.E., Wigdorovitz, A. and Borca, M.V. (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**, 1838-1843.
- Dus Santos, M.J., Wigdorovitz, A., Trono, K., Rios, R.D., Franzone, P.M., Gil, F., Moreno, J., Carrillo, C., Escribano, J.M. and Borca, M.V. (2002) A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants. *Vaccine* **20**, 1141-1147.
- EC (2013) Commission Implementing Regulation (EU) No 503/2013 of 3 April 2013 on applications for authorisation of genetically modified food and feed in accordance with Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulations (EC) No 641/2004 and (EC) No 1981/2006. *Official Journal of the European Communities*, 1-48.
- EFSA (2004) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *EFSA Journal*, 1-18.
- EFSA (2009) Consolidated presentation of the joint Scientific Opinion of the GMO and BIOHAZ Panels on the "Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants" and the Scientific Opinion of the GMO Panel on "Consequences of the Opinion on the Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants on Previous EFSA Assessments of Individual GM Plants." *EFSA Journal*, 1-8.
- Elizabeth, P. (2005) Engineering the chloroplast genome. *Reson* **10**, 94-95.
- EMA (2015) Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants. *Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC50003153.pdf*.
- Erdner, D.L., Price, N.M., Doucette, G.J., Peleato, M.L. and Anderson, D.M. (1999) Characterization of ferredoxin and flavodoxin as markers of iron limitation in marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* **184**, 43-53.
- Estes, M.K., Kang, G., Zeng, C.Q., Crawford, S.E. and Ciarlet, M. (2001) Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. *Novartis Found Symp* **238**, 82-96; discussion 96-100.
- EU (2001) Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. *Official Journal of the European Communities*, 1-38.
- Fagard, M. and Vaucheret, H. (2000) (TRANS)GENE SILENCING IN PLANTS: How Many Mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**, 167-194.
- Falk, S., Samson, G., Bruce, D., Huner, N.P. and Laudenbach, D.E. (1995) Functional analysis of the iron-stress induced CP 43' polypeptide of PS II in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Photosynth Res* **45**, 51-60.
- Fernandez, F.M., Conner, M.E., Hodgins, D.C., Parwani, A.V., Nielsen, P.R., Crawford, S.E., Estes, M.K. and Saif, L.J. (1998) Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine* **16**, 507-516.
- Fischer, R., Schillberg, S., Buyel, J.F. and Twyman, R.M. (2013) Commercial aspects of pharmaceutical protein production in plants. *Curr Pharm Des* **19**, 5471-5477.
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. and Twyman, R.M. (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 152-158.
- Floss, D.M., Falkenburg, D. and Conrad, U. (2007) Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Research* **16**, 315-332.
- Fox, J.L. (2012) First plant-made biologic approved. *Nat Biotech* **30**, 472-472.
- Fragoso, G., Esquivel-Guadarrama, F., Santana, M.A., Bobes, R.J., Hernandez, B., Cervantes, J., Segura, R., Goldbaum, F.A., Scitutto, E. and Rosas, G. (2011) Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity. *Clin Vaccine Immunol* **18**, 1067-1076.
- Garaicoechea, L., Bok, K., Jones, L.R., Combessies, G., Odeón, A., Fernandez, F. and Parreño, V. (2006) Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994–2003). *Veterinary Microbiology* **118**, 1-11.

- Garaicoechea, L., Mino, S., Ciarlet, M., Fernandez, F., Barrandeguy, M. and Parreno, V. (2011) Molecular characterization of equine rotaviruses circulating in Argentinean foals during a 17-year surveillance period (1992-2008). *Vet Microbiol* **148**, 150-160.
- Giddings, G. (2001) Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology* **12**, 450-454.
- Goldschmidt-Clermont, M. (1991) Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of chlamydomonas. *Nucleic Acids Res* **19**, 4083-4089.
- Gomez, E., Lucero, M.S., Chimeno Zoth, S., Carballeda, J.M., Gravisaco, M.J. and Berinstein, A. (2013) Transient expression of VP2 in *Nicotiana benthamiana* and its use as a plant-based vaccine against infectious bursal disease virus. *Vaccine* **31**, 2623-2627.
- Gomord, V. and Faye, L. (2004) Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 171-181.
- Gomord, V., Fitchette, A.C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D. and Faye, L. (2010) Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnol J* **8**, 564-587.
- Guerrero-Andrade, O., Loza-Rubio, E., Olivera-Flores, T., Fehervari-Bone, T. and Gomez-Lim, M.A. (2006) Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Res* **15**, 455-463.
- Hagemann, M., Jeanjean, R., Fulda, S., Havaux, M., Joset, F. and Erdmann, N. (1999) Flavodoxin accumulation contributes to enhanced cyclic electron flow around photosystem I in salt-stressed cells of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Physiologia Plantarum* **105**, 670-678.
- Hanke, G.T. and Hase, T. (2008) Variable Photosynthetic Roles of Two Leaf-type Ferredoxins in *Arabidopsis*, as Revealed by RNA Interference†. *Photochemistry and Photobiology* **84**, 1302-1309.
- Hase, T., Schürmann, P. and Knaff, D. (2006) The Interaction of Ferredoxin with Ferredoxin-Dependent Enzymes. In: *Photosystem I* (Golbeck, J. ed) pp. 477-498. Springer Netherlands.
- Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M., Yamamoto, T. and Ebina, T. (1993) Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**, 1077-1081.
- Hiatt, A., Cafferkey, R. and Bowdish, K. (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342**, 76-78.
- Holtgreffe, S., Bader, K.P., Horton, P., Scheibe, R., von Schaewen, A. and Backhausen, J.E. (2003) Decreased Content of Leaf Ferredoxin Changes Electron Distribution and Limits Photosynthesis in Transgenic Potato Plants. *Plant Physiology* **133**, 1768-1778.
- Hood, E., Witcher, D., Maddock, S., Meyer, T., Baszczynski, C., Bailey, M., Flynn, P., Register, J., Marshall, L., Bond, D., Kulisek, E., Kusnadi, A., Evangelista, R., Nikolov, Z., Wooge, C., Mehig, R., Hernan, R., Kappel, W., Ritland, D., Ping Li, C. and Howard, J. (1997) Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding* **3**, 291-306.
- Hood, E.E., Bailey, M.R., Beifuss, K., Magallanes-Lundback, M., Horn, M.E., Callaway, E., Drees, C., Delaney, D.E., Clough, R. and Howard, J.A. (2003) Criteria for high-level expression of a fungal laccase gene in transgenic maize. *Plant Biotechnol J* **1**, 129-140.
- Iamtham, S. and Day, A. (2000) Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nat Biotechnol* **18**, 1172-1176.
- Jin, S. and Daniell, H. (2015) The Engineered Chloroplast Genome Just Got Smarter. *Trends in Plant Science* **20**, 622-640.
- Kalica, A.R., Flores, J. and Greenberg, H.B. (1983) Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology* **125**, 194-205.
- Kang, T.J., Han, S.C., Kim, M.Y., Kim, Y.S. and Yang, M.S. (2004) Expression of non-toxic mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco chloroplasts. *Protein Expr Purif* **38**, 123-128.
- Kang, T.J., Loc, N.H., Jang, M.O., Jang, Y.S., Kim, Y.S., Seo, J.E. and Yang, M.S. (2003) Expression of the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin in the chloroplasts of plants and its characterization. *Transgenic Res* **12**, 683-691.
- Kay, E., Vogel, T.M., Bertolla, F., Nalin, R. and Simonet, P. (2002) In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3345-3351.

- Knaff, D. (1996) Ferredoxin and Ferredoxin-Dependent Enzymes. In: *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D., Yocum, C. and Heichel, I. eds), pp. 333-361. Springer Netherlands.
- Kolotilin, I., Kaldis, A., Devriendt, B., Joensuu, J., Cox, E. and Menassa, R. (2012) Production of a subunit vaccine candidate against porcine post-weaning diarrhea in high-biomass transplastomic tobacco. *PLoS One* **7**, e42405.
- Koya, V., Moayeri, M., Leppla, S.H. and Daniell, H. (2005) Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect Immun* **73**, 8266-8274.
- Kumar, S., Hahn, F.M., Baidoo, E., Kahlon, T.S., Wood, D.F., McMahan, C.M., Cornish, K., Keasling, J.D., Daniell, H. and Whalen, M.C. (2012) Remodeling the isoprenoid pathway in tobacco by expressing the cytoplasmic mevalonate pathway in chloroplasts. *Metab Eng* **14**, 19-28.
- Kuroki, M., Ohta, M., Ikemori, Y., Peralta, R.C., Yokoyama, H. and Kodama, Y. (1994) Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. *Arch Virol* **138**, 143-148.
- Kwon, K.-C. and Daniell, H. (2015) Low-cost oral delivery of protein drugs bioencapsulated in plant cells. *Plant Biotechnology Journal* **13**, 1017-1022.
- Kwon, K.-C., Nityanandam, R., New, J.S. and Daniell, H. (2013a) Oral delivery of bioencapsulated exendin-4 expressed in chloroplasts lowers blood glucose level in mice and stimulates insulin secretion in beta-TC6 cells. *Plant Biotechnology Journal* **11**, 77-86.
- Kwon, K.-C., Verma, D., Singh, N.D., Herzog, R. and Daniell, H. (2013b) Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 782-799.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lakshmi, P.S., Verma, D., Yang, X., Lloyd, B. and Daniell, H. (2013) Low cost tuberculosis vaccine antigens in capsules: expression in chloroplasts, bio-encapsulation, stability and functional evaluation in vitro. *PLoS One* **8**, e54708.
- Lamphear, B.J., Jilka, J.M., Kesl, L., Welter, M., Howard, J.A. and Streatfield, S.J. (2004) A corn-based delivery system for animal vaccines: an oral transmissible gastroenteritis virus vaccine boosts lactogenic immunity in swine. *Vaccine* **22**, 2420-2424.
- Landry, N., Pillet, S., Favre, D., Poulin, J.-F., Trépanier, S., Yassine-Diab, B. and Ward, B.J. (2014) Influenza virus-like particle vaccines made in *Nicotiana benthamiana* elicit durable, poly-functional and cross-reactive T cell responses to influenza HA antigens. *Clinical Immunology* **154**, 164-177.
- Lau, O.S. and Sun, S.S.M. (2009) Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. *Biotechnology Advances* **27**, 1015-1022.
- Leelavathi, S. and Reddy, V. (2003) Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. *Molecular Breeding* **11**, 49-58.
- Lentz, E.M. (2011) Producción de antígenos y anticuerpos de interés veterinario en plantas transplásticas de tabaco. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Lentz, E.M., Garaicoechea, L., Alfano, E.F., Parreño, V., Wigdorovitz, A. and Bravo-Almonacid, F.F. (2012) Translational fusion and redirection to thylakoid lumen as strategies to improve the accumulation of a camelid antibody fragment in transplastomic tobacco. *Planta* **236**, 703-714.
- Lentz, E.M., Mozgovej, M.V., Bellido, D., Santos, M.J.D., Wigdorovitz, A. and Bravo-Almonacid, F.F. (2011) VP8* antigen produced in tobacco transplastomic plants confers protection against bovine rotavirus infection in a suckling mouse model. *Journal of Biotechnology* **156**, 100-107.
- Lentz, E.M., Segretin, M.E., Morgenfeld, M.M., Wirth, S.A., Dus Santos, M.J., Mozgovej, M.V., Wigdorovitz, A. and Bravo-Almonacid, F.F. (2009) High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants. *Planta* **231**, 387-395.
- Li, Y., Sun, M., Liu, J., Yang, Z., Zhang, Z. and Shen, G. (2006) High expression of foot-and-mouth disease virus structural protein VP1 in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Rep* **25**, 329-333.
- Liew, P.S. and Hair-Bejo, M. (2015) Farming of Plant-Based Veterinary Vaccines and Their Applications for Disease Prevention in Animals. *Advances in Virology* **2015**, 1-12.
- Lodeyro, A.F., Ceccoli, R.D., Pierella Karlusich, J.J. and Carrillo, N. (2012) The importance of flavodoxin for environmental stress tolerance in photosynthetic microorganisms and transgenic plants. Mechanism, evolution and biotechnological potential. *FEBS Letters* **586**, 2917-2924.

- Lohse, M., Drechsel, O., Kahlau, S. and Bock, R. (2013) OrganellarGenomeDRAW--a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets. *Nucleic Acids Res* **41**, W575-581.
- Love, A.J., Chapman, S.N., Matic, S., Noris, E., Lomonosoff, G.P. and Taliansky, M. (2012) In planta production of a candidate vaccine against bovine papillomavirus type 1. *Planta* **236**, 1305-1313.
- Lutz, K.A., Svab, Z. and Maliga, P. (2006) Construction of marker-free transplastomic tobacco using the Cre-loxP site-specific recombination system. *Nat Protoc* **1**, 900-910.
- Lyon, G.M., Mehta, A.K., Varkey, J.B., Brantly, K., Plyler, L., McElroy, A.K., Kraft, C.S., Towner, J.S., Spiropoulou, C., Ströher, U., Uyeki, T.M. and Ribner, B.S. (2014) Clinical Care of Two Patients with Ebola Virus Disease in the United States. *New England Journal of Medicine* **371**, 2402-2409.
- Ma, J.K., Drake, P.M. and Christou, P. (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* **4**, 794-805.
- Ma, J.K.C., Hikmat, B.Y., Wycoff, K., Vine, N.D., Chargelegue, D., Yu, L., Hein, M.B. and Lehner, T. (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* **4**, 601-606.
- Martella, V., Bányai, K., Matthijnsens, J., Buonavoglia, C. and Ciarlet, M. (2010) Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology* **140**, 246-255.
- Martin-Alonso, J.M., Castanon, S., Alonso, P., Parra, F. and Ordas, R. (2003) Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *Transgenic Res* **12**, 127-130.
- Mason, H.S., Warzecha, H., Mor, T. and Arntzen, C.J. (2002) Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol Med* **8**, 324-329.
- Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S.M., Palombo, E.A., Iturriza-Gomara, M., Maes, P., Patton, J.T., Rahman, M. and Van Ranst, M. (2008) Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* **82**, 3204-3219.
- Mazouni, K., Domain, F., Chauvat, F. and Cassier-Chauvat, C. (2003) Expression and regulation of the crucial plant-like ferredoxin of cyanobacteria. *Molecular Microbiology* **49**, 1019-1029.
- Meeusen, E.N., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.P. and Jungersen, G. (2007) Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev* **20**, 489-510, table of contents.
- Mett, V., Farrance, C.E., Green, B.J. and Yusibov, V. (2008) Plants as biofactories. *Biologicals* **36**, 354-358.
- Miki, B. and McHugh, S. (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol* **107**, 193-232.
- Miyake, C. and Asada, K. (1994) Ferredoxin-Dependent Photoreduction of the Monodehydroascorbate Radical in Spinach Thylakoids. *Plant and Cell Physiology* **35**, 539-549.
- Molina, A., Hervas-Stubbs, S., Daniell, H., Mingo-Castel, A.M. and Veramendi, J. (2004) High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J* **2**, 141-153.
- Molina, A., Veramendi, J. and Hervas-Stubbs, S. (2005) Induction of neutralizing antibodies by a tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from canine parvovirus. *Virology* **342**, 266-275.
- Morgenfeld, M., Lentz, E., Segretin, M.E., Alfano, E.F. and Bravo-Almonacid, F. (2014) Translational Fusion and Redirection to Thylakoid Lumen as Strategies to Enhance Accumulation of Human Papillomavirus E7 Antigen in Tobacco Chloroplasts. *Molecular Biotechnology* **56**, 1021-1031.
- Morgenfeld, M., Segretin, M.E., Wirth, S., Lentz, E., Zelada, A., Mentaberry, A., Gissmann, L. and Bravo-Almonacid, F. (2009) Potato Virus X Coat Protein Fusion to Human Papillomavirus 16 E7 Oncoprotein Enhance Antigen Stability and Accumulation in Tobacco Chloroplast. *Molecular Biotechnology* **43**, 243-249.
- Mozgovo, M.V. (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. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Muskett, J.C., Reed, N.E. and Thornton, D.H. (1985) Increased virulence of an infectious bursal disease live virus vaccine after passage in chicks. *Vaccine* **3**, 309-312.
- Nakazono, M. and Hirai, A. (1993) Identification of the entire set of transferred chloroplast DNA sequences in the mitochondrial genome of rice. *Mol Gen Genet* **236**, 341-346.

- Nelson, G., Marconi, P., Periolo, O., La Torre, J. and Alvarez, M.A. (2012) Immunocompetent truncated E2 glycoprotein of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) expressed in *Nicotiana tabacum* plants: a candidate antigen for new generation of veterinary vaccines. *Vaccine* **30**, 4499-4504.
- Nogués, I., Tejero, J., Hurley, J.K., Paladini, D., Frago, S., Tollin, G., Mayhew, S.G., Gómez-Moreno, C., Ceccarelli, E.A., Carrillo, N. and Medina, M. (2004) Role of the C-Terminal Tyrosine of Ferredoxin-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Reductase in the Electron Transfer Processes with Its Protein Partners Ferredoxin and Flavodoxin†. *Biochemistry* **43**, 6127-6137.
- Obembe, O.O., Popoola, J.O., Leelavathi, S. and Reddy, S.V. (2011) Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances* **29**, 210-222.
- Oey, M., Lohse, M., Kreikemeyer, B. and Bock, R. (2009) Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant J* **57**, 436-445.
- Pan, L., Zhang, Y., Wang, Y., Wang, B., Wang, W., Fang, Y., Jiang, S., Lv, J., Sun, Y. and Xie, Q. (2008) Foliar extracts from transgenic tomato plants expressing the structural polyprotein, P1-2A, and protease, 3C, from foot-and-mouth disease virus elicit a protective response in guinea pigs. *Vet Immunol Immunopathol* **121**, 83-90.
- Paul, M.J., Teh, A.Y., Twyman, R.M. and Ma, J.K. (2013) Target product selection - where can Molecular Pharming make the difference? *Curr Pharm Des* **19**, 5478-5485.
- Perez Aguirreburualde, M.S., Gomez, M.C., Ostachuk, A., Wolman, F., Albanesi, G., Pecora, A., Odeon, A., Ardila, F., Escribano, J.M., Dus Santos, M.J. and Wigdorovitz, A. (2013) Efficacy of a BVDV subunit vaccine produced in alfalfa transgenic plants. *Vet Immunol Immunopathol* **151**, 315-324.
- Pérez Filgueira, D.M., Mozgovej, M., Wigdorovitz, A., Dus Santos, M.J., Parreño, V., Trono, K., Fernandez, F.M., Carrillo, C., Babiuk, L.A., Morris, T.J. and Borca, M.V. (2004) Passive protection to bovine rotavirus (BRV) infection induced by a BRV VP8* produced in plants using a TMV-based vector. *Arch Virol* **149**, 2337-2348.
- Peyret, H. and Lomonossoff, G.P. (2015) When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnology Journal* **13**, 1121-1135.
- Poncelet, M., Cassier-Chauvat, C., Leschelle, X., Bottin, H. and Chauvat, F. (1998) Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC6803 by plasmid shuffling. *Molecular Microbiology* **28**, 813-821.
- Pontiroli, A., Rizzi, A., Simonet, P., Daffonchio, D., Vogel, T.M. and Monier, J.M. (2009) Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco. *Appl Environ Microbiol* **75**, 3314-3322.
- Pujol, M., Ramirez, N.I., Ayala, M., Gavilondo, J.V., Valdes, R., Rodriguez, M., Brito, J., Padilla, S., Gomez, L., Reyes, B., Peral, R., Perez, M., Marcelo, J.L., Mila, L., Sanchez, R.F., Paez, R., Cremata, J.A., Enriquez, G., Mendoza, O., Ortega, M. and Borroto, C. (2005) An integral approach towards a practical application for a plant-made monoclonal antibody in vaccine purification. *Vaccine* **23**, 1833-1837.
- Ramessar, K., Peremarti, A., Gomez-Galera, S., Naqvi, S., Moralejo, M., Munoz, P., Capell, T. and Christou, P. (2007) Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics. *Transgenic Res* **16**, 261-280.
- Rao, J.P., Agrawal, P., Mohammad, R., Rao, S.K., Reddy, G.R., Dechamma, H.J. and VV, S.S. (2012) Expression of VP1 protein of serotype A and O of foot-and-mouth disease virus in transgenic sunn hemp plants and its immunogenicity for guinea pigs. *Acta Virol* **56**, 91-99.
- Reed, J.L. and Muench, H. (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Epidemiol* **27**, 493-497.
- Reilly, R.M., Domingo, R. and Sandhu, J. (1997) Oral delivery of antibodies. Future pharmacokinetic trends. *Clin Pharmacokinet* **32**, 313-323.
- Rogalski, M., do Nascimento Vieira, L., Fraga, H.P. and Guerra, M.P. (2015) Plastid genomics in horticultural species: importance and applications for plant population genetics, evolution, and biotechnology. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Rosas, G., Fragoso, G., Ainciart, N., Esquivel-Guadarrama, F., Santana, A., Bobes, R.J., Ramírez-Pliego, O., Toledo, A., Cruz-Revilla, C., Meneses, G., Berguer, P., Goldbaum, F.A. and Sciotto, E. (2006) *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. *Microbes and Infection* **8**, 1277-1286.

- Ruf, S., Biehler, K. and Bock, R. (2000) A small chloroplast-encoded protein as a novel architectural component of the light-harvesting antenna. *J Cell Biol* **149**, 369-378.
- Ruggeri, F.M. and Greenberg, H.B. (1991) Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J Virol* **65**, 2211-2219.
- Ruhlman, T., Verma, D., Samson, N. and Daniell, H. (2010) The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression. *Plant Physiol* **152**, 2088-2104.
- Ruiz, V., Mozgovej, M.V., Dus Santos, M.J. and Wigdorovitz, A. (2015) Plant-produced viral bovine vaccines: what happened during the last 10 years? *Plant Biotechnology Journal* **13**, 1071-1077.
- Rybicki, E.P. (2009) Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug Discov Today* **14**, 16-24.
- Rybicki, E.P. (2010) Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 620-637.
- Rybicki, E.P. (2014) Plant-based vaccines against viruses. *Virol J* **11**, 205.
- Saif, L., Rosen, B. and Parwani, A. (1994) Animal rotaviruses. *Virus Infections of the Gastrointestinal Tract*, 279-367.
- Saif, L.J. and Fernandez, F.M. (1996) Group A rotavirus veterinary vaccines. *J Infect Dis* **174 Suppl 1**, S98-106.
- Saito, M.A., Bertrand, E.M., Dutkiewicz, S., Bulygin, V.V., Moran, D.M., Monteiro, F.M., Follows, M.J., Valois, F.W. and Waterbury, J.B. (2011) Iron conservation by reduction of metalloenzyme inventories in the marine diazotroph *Crocospaera watsonii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 2184-2189.
- Sala, F., Manuela Rigano, M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A.M. and Castiglione, S. (2003) Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine* **21**, 803-808.
- Saldana, S., Esquivel Guadarrama, F., Olivera Flores Tde, J., Arias, N., Lopez, S., Arias, C., Ruiz-Medrano, R., Mason, H., Mor, T., Richter, L., Arntzen, C.J. and Gomez Lim, M.A. (2006) Production of rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies. *Viral Immunol* **19**, 42-53.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*, 2nd edition. Ed: Nolan, C. Cold Spring Harbor Laboratory Press. .
- Sancho, J. (2006) Flavodoxins: sequence, folding, binding, function and beyond. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 855-864.
- Santi, L. (2009) Plant derived veterinary vaccines. *Vet Res Commun* **33 Suppl 1**, 61-66.
- Sarker, S.A., Pant, N., Juneja, L.R. and Hammarstrom, L. (2007) Successful treatment of rotavirus-induced diarrhoea in suckling mice with egg yolk immunoglobulin. *J Health Popul Nutr* **25**, 465-468.
- Scotti, N. and Rybicki, E.P. (2013) Virus-like particles produced in plants as potential vaccines. *Expert Rev Vaccines* **12**, 211-224.
- Schade, R., Calzado, E.G., Sarmiento, R., Chacana, P.A., Porankiewicz-Asplund, J. and Terzolo, H.R. (2005) Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim* **33**, 129-154.
- Scheibe, R. (1991) Redox-modulation of chloroplast enzymes : a common principle for individual control. *Plant Physiol* **96**, 1-3.
- Scheller, H.V. (1996) In Vitro Cyclic Electron Transport in Barley Thylakoids follows Two Independent Pathways. *Plant Physiology* **110**, 187-194.
- Schurmann, P. and Buchanan, B.B. (2008) The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxid Redox Signal* **10**, 1235-1274.
- Segretin, M.E. (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.
- Segretin, M.E., Lentz, E.M., Wirth, S.A., Morgenfeld, M.M. and Bravo-Almonacid, F.F. (2011) Transformation of *Solanum tuberosum* plastids allows high expression levels of β -glucuronidase both in leaves and microtubers developed in vitro. *Planta* **235**, 807-818.
- Shaaltiel, Y., Bartfeld, D., Hashmueli, S., Baum, G., Brill-Almon, E., Galili, G., Dym, O., Boldin-Adamsky, S.A., Silman, I., Sussman, J.L., Futerman, A.H. and Aviezer, D. (2007) Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 579-590.
- Shams, H. (2005) Recent developments in veterinary vaccinology. *The Veterinary Journal* **170**, 289-299.

- Shen, H., Qian, B., Chen, W., Liu, Z., Yang, L., Zhang, D. and Liang, W. (2010) Immunogenicity of recombinant F4 (K88) fimbrial adhesin FaeG expressed in tobacco chloroplast. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **42**, 558-567.
- Shikanai, T. (2007) Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 199-217.
- Singh, A.K., Li, H. and Sherman, L.A. (2004) Microarray analysis and redox control of gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Physiologia Plantarum* **120**, 27-35.
- Spök, A., Twyman, R.M., Fischer, R., Ma, J.K.C. and Sparrow, P.A.C. (2008) Evolution of a regulatory framework for pharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Trends in Biotechnology* **26**, 506-517.
- Staub, J.M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P.T., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J.A., Spatola, L., Ward, D., Ye, G. and Russell, D.A. (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* **18**, 333-338.
- Stencel-Baerenwald, J.E., Reiss, K., Reiter, D.M., Stehle, T. and Dermody, T.S. (2014) The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions. *Nat Rev Microbiol* **12**, 739-749.
- Stern, D.B. and Lonsdale, D.M. (1982) Mitochondrial and chloroplast genomes of maize have a 12-kilobase DNA sequence in common. *Nature* **299**, 698-702.
- Stoger, E., Fischer, R., Moloney, M. and Ma, J.K.C. (2014) Plant Molecular Pharming for the Treatment of Chronic and Infectious Diseases. *Annual Review of Plant Biology* **65**, 743-768.
- Streatfield, S.J. and Howard, J.A. (2003) Plant-based vaccines. *International Journal for Parasitology* **33**, 479-493.
- Streatfield, S.J., Jilka, J.M., Hood, E.E., Turner, D.D., Bailey, M.R., Mayor, J.M., Woodard, S.L., Beifuss, K.K., Horn, M.E., Delaney, D.E., Tizard, I.R. and Howard, J.A. (2001) Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine* **19**, 2742-2748.
- Streatfield, S.J., Kushnir, N. and Yusibov, V. (2015) Plant-produced candidate countermeasures against emerging and reemerging infections and bioterror agents. *Plant Biotechnol J* **13**, 1136-1159.
- Su, J., Zhu, L., Sherman, A., Wang, X., Lin, S., Kamesh, A., Norikane, J.H., Streatfield, S.J., Herzog, R.W. and Daniell, H. (2015) Low cost industrial production of coagulation factor IX bioencapsulated in lettuce cells for oral tolerance induction in hemophilia B. *Biomaterials* **70**, 84-93.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P. and Maliga, P. (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8526-8530.
- Svab, Z. and Maliga, P. (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 913-917.
- Svendsen, L., Crowley, A., Ostergaard, L.H., Stodulski, G. and Hau, J. (1995) Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Lab Anim Sci* **45**, 89-93.
- Thuenemann, E.C., Meyers, A.E., Verwey, J., Rybicki, E.P. and Lomonosoff, G.P. (2013) A method for rapid production of heteromultimeric protein complexes in plants: assembly of protective bluetongue virus-like particles. *Plant Biotechnol J* **11**, 839-846.
- To, T.L., Ward, L.A., Yuan, L. and Saif, L.J. (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 (Pt 11)**, 2661-2672.
- Tognetti, V.B., Monti, M.R., Valle, E.M., Carrillo, N. and Smania, A.M. (2007a) Detoxification of 2,4-dinitrotoluene by transgenic tobacco plants expressing a bacterial flavodoxin. *Environ Sci Technol* **41**, 4071-4076.
- Tognetti, V.B., Palatnik, J.F., Fillat, M.F., Melzer, M., Hajirezaei, M.R., Valle, E.M. and Carrillo, N. (2006) Functional replacement of ferredoxin by a cyanobacterial flavodoxin in tobacco confers broad-range stress tolerance. *Plant Cell* **18**, 2035-2050.
- Tognetti, V.B., Zurbriggen, M.D., Morandi, E.N., Fillat, M.F., Valle, E.M., Hajirezaei, M.R. and Carrillo, N. (2007b) Enhanced plant tolerance to iron starvation by functional substitution of chloroplast ferredoxin with a bacterial flavodoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11495-11500.
- Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. and Fischer, R. (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol* **21**, 570-578.
- Vega, C., Bok, M., Chacana, P., Saif, L., Fernandez, F. and Parreno, V. (2011) Egg yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Vet Immunol Immunopathol* **142**, 156-169.

- Vega, C.G., Bok, M., Vlasova, A.N., Chattha, K.S., Fernandez, F.M., Wigdorovitz, A., Parreno, V.G. and Saif, L.J. (2012) IgY antibodies protect against human Rotavirus induced diarrhea in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. *PLoS One* **7**, e42788.
- Velikovskiy, C.A., Cassataro, J., Giambartolomei, G.H., Goldbaum, F.A., Estein, S., Bowden, R.A., Bruno, L., Fossati, C.A. and Spitz, M. (2002) A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun* **70**, 2507-2511.
- Velikovskiy, C.A., Goldbaum, F.A., Cassataro, J., Estein, S., Bowden, R.A., Bruno, L., Fossati, C.A. and Giambartolomei, G.H. (2003) *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infect Immun* **71**, 5750-5755.
- Venkataram Prasad, B.V. and Estes, M.K. (2000) Electron cryomicroscopy and computer image processing techniques : use in structure-function studies of rotavirus. *Methods Mol Med* **34**, 9-31.
- Vermij, P. and Waltz, E. (2006) USDA approves the first plant-based vaccine. *Nature Biotechnology* **24**, 233-234.
- Voss, I., Koelmann, M., Wojtera, J., Holtgreffe, S., Kitzmann, C., Backhausen, J.E. and Scheibe, R. (2008) Knockout of major leaf ferredoxin reveals new redox-regulatory adaptations in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **133**, 584-598.
- Waheed, M.T., Thönes, N., Müller, M., Hassan, S.W., Gottschamel, J., Lössl, E., Kaul, H.-P. and Lössl, A.G. (2011) Plastid expression of a double-pentameric vaccine candidate containing human papillomavirus-16 L1 antigen fused with LTB as adjuvant: transplastomic plants show pleiotropic phenotypes. *Plant Biotechnology Journal* **9**, 651-660.
- Wang, D.M., Zhu, J.B., Peng, M. and Zhou, P. (2008) Induction of a protective antibody response to FMDV in mice following oral immunization with transgenic *Stylosanthes* spp. as a feedstuff additive. *Transgenic Res* **17**, 1163-1170.
- Wang, Y., Shen, Q., Jiang, Y., Song, Y., Fang, L., Xiao, S. and Chen, H. (2012) Immunogenicity of foot-and-mouth disease virus structural polyprotein P1 expressed in transgenic rice. *J Virol Methods* **181**, 12-17.
- Watson, J., Koya, V., Leppla, S.H. and Daniell, H. (2004) Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop. *Vaccine* **22**, 4374-4384.
- Wigdorovitz, A., Carrillo, C., Dus Santos, M.J., Trono, K., Peralta, A., Gomez, M.C., Rios, R.D., Franzone, P.M., Sadir, A.M., Escribano, J.M. and Borca, M.V. (1999) Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology* **255**, 347-353.
- Wigdorovitz, A., Mozgovej, M., Santos, M.J., Parreno, V., Gomez, C., Perez-Filgueira, D.M., Trono, K.G., Rios, R.D., Franzone, P.M., Fernandez, F., Carrillo, C., Babiuk, L.A., Escribano, J.M. and Borca, M.V. (2004) Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants. *J Gen Virol* **85**, 1825-1832.
- Wirth, S., Calamante, G., Mentaberry, A., Bussmann, L., Lattanzi, M., Barañao, L. and 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, S., Segretin, M.E., Mentaberry, A. and Bravo-Almonacid, F. (2006) Accumulation of hEGF and hEGF-fusion proteins in chloroplast-transformed tobacco plants is higher in the dark than in the light. *J Biotechnol* **125**, 159-172.
- Wirth, S.A. (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.
- Witcher, D., Hood, E., Peterson, D., Bailey, M., Bond, D., Kusnadi, A., Evangelista, R., Nikolov, Z., Wooge, C., Mehig, R., Kappel, W., Register, J. and Howard, J. (1998) Commercial production of β -glucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants. *Molecular Breeding* **4**, 301-312.
- Wögerbauer, M. (2007) *Risk Assessment of Antibiotic Resistance Marker Genes in Genetically Modified Organisms: A Comprehensive Report*:BMGFJ.
- Woodard, S.L., Mayor, J.M., Bailey, M.R., Barker, D.K., Love, R.T., Lane, J.R., Delaney, D.E., McComas-Wagner, J.M., Mallubhotla, H.D., Hood, E.E., Dangott, L.J., Tichy, S.E. and Howard, J.A. (2003) Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnol Appl Biochem* **38**, 123-130.

- Woolhouse, M.E. and Gowtage-Sequeria, S. (2005) Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis* **11**, 1842-1847.
- Wu, J., Yu, L., Li, L., Hu, J., Zhou, J. and Zhou, X. (2007) Oral immunization with transgenic rice seeds expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus induces protective immune responses in chickens. *Plant Biotechnol J* **5**, 570-578.
- Yang, C.D., Liao, J.T., Lai, C.Y., Jong, M.H., Liang, C.M., Lin, Y.L., Lin, N.S., Hsu, Y.H. and Liang, S.M. (2007) Induction of protective immunity in swine by recombinant bamboo mosaic virus expressing foot-and-mouth disease virus epitopes. *BMC Biotechnol* **7**, 62.
- Yang, Y., Li, X., Yang, H., Qian, Y., Zhang, Y., Fang, R. and Chen, X. (2011) Immunogenicity and virus-like particle formation of rotavirus capsid proteins produced in transgenic plants. *Sci China Life Sci* **54**, 82-89.
- Yu, X., Mishra, R., Holloway, G., von Itzstein, M., Coulson, B.S. and Blanchard, H. (2015) Substantial Receptor-induced Structural Rearrangement of Rotavirus VP8*: Potential Implications for Cross-Species Infection. *ChemBiochem* **16**, 2176-2181.
- Zhang, Y., Li, J., Pu, H., Jin, J., Zhang, X., Chen, M., Wang, B., Han, C., Yu, J. and Li, D. (2010) Development of Tobacco necrosis virus A as a vector for efficient and stable expression of FMDV VP1 peptides. *Plant Biotechnol J* **8**, 506-523.
- Zhong, G.-Y., Peterson, D., Delaney, D., Bailey, M., Witcher, D., Register Iii, J., Bond, D., Li, C.-P., Marshall, L., Kulisek, E., Ritland, D., Meyer, T., Hood, E. and Howard, J. (1999) Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Molecular Breeding* **5**, 345-356.
- Zhou, B., Zhang, Y., Wang, X., Dong, J., Wang, B., Han, C., Yu, J. and Li, D. (2010) Oral administration of plant-based rotavirus VP6 induces antigen-specific IgAs, IgGs and passive protection in mice. *Vaccine* **28**, 6021-6027.
- Zhou, J.Y., Wu, J.X., Cheng, L.Q., Zheng, X.J., Gong, H., Shang, S.B. and Zhou, E.M. (2003) Expression of immunogenic S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus in transgenic potatoes. *J Virol* **77**, 9090-9093.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W. (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiology* **136**, 2621-2632.
- Zurbriggen, M., Tognetti, V.B., Valle, E.M. and Carrillo, N. (2007) Cyanobacterial Flavodoxin provides multiple Stress tolerance. *ISB News Report*.
- Zurbriggen, M.D., Carrillo, N., Tognetti, V.B., Melzer, M., Peisker, M., Hause, B. and Hajirezaei, M.R. (2009) Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant J* **60**, 962-973.
- Zurbriggen, M.D., Hajirezaei, M.-R. and Carrillo, N. (2010) Engineering the future. Development of transgenic plants with enhanced tolerance to adverse environments. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **27**, 33-56.
- Zurbriggen, M.D., Tognetti, V.B., Fillat, M.F., Hajirezaei, M.R., Valle, E.M. and Carrillo, N. (2008) Combating stress with flavodoxin: a promising route for crop improvement. *Trends Biotechnol* **26**, 531-537.
- Zylberman, V., Craig, P.O., Klinke, S., Braden, B.C., Cauerhff, A. and Goldbaum, F.A. (2004) High order quaternary arrangement confers increased structural stability to *Brucella* sp. lumazine synthase. *J Biol Chem* **279**, 8093-8101.