

EXPRESION DE GENES QUIMÉRICOS *gag* DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH-1) EN TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Y EN *Escherichia coli*

EXPRESSION OF CHIMERIC *gag* GENES FROM HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS IN TOMATO (*Lycopersicon esculentum* Mill.) AND *Escherichia coli*

Alberto J. Donayre Torres, Cristina Reynaga Peña y Miguel A. Gómez Lim*

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato. Km. 9.6 Libramiento Norte, 36500 Carretera Irapuato-León. Irapuato, Guanajuato. Tel. 01-462-6239600 Ext. 401.

*Autor para correspondencia (mgomez@ira.cinvestav.mx)

RESUMEN

La secuencia nativa del gen *gag* del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) se expresó tanto en plantas transformadas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) como en *E. coli*. Dos versiones quiméricas del gen *gag* (*gag-ENV* y *gag-RT*) se expresaron independientemente. El análisis de la expresión permitió detectar el ARNm de las construcciones en tejidos de hoja y fruto de tomate. Sin embargo, no se pudo detectar la presencia de la proteína Gag completa, aunque el anticuerpo sí detectó un dominio (p24) de Gag expresado en frutos de dos líneas transgénicas Gag-ENV. En la expresión del VIH en células de mamíferos, las secuencias nativas de genes tardíos como *gag* promueven la desestabilización de los mensajeros virales, que probablemente también se produzca en las células vegetales. Gag es capaz de formar partículas tipo virus (PTV) del VIH en sistemas de expresión heteróloga, como *E. coli* y levaduras. En este trabajo, las construcciones Gag-RT y Gag-ENV se expresaron en células de *E. coli* para confirmar si las proteínas quiméricas Gag-ENV y Gag-RT podían formar PTV. La expresión de estas construcciones rindieron niveles en *E. coli* de 2 mg L⁻¹ para la proteína Gag-RT y de 4 mg L⁻¹ para Gag-ENV, de proteína purificada. Micrografías electrónicas permitieron verificar la formación de PTV en el citoplasma de *E. coli* expresando la proteína Gag-ENV, lo cual indica que la fusión de los epítomos no interfirió con el ensamblaje de Gag en células bacterianas.

Palabras clave: *Lycopersicon esculentum* Mill., transformación genética, Gag (VIH-1), partículas tipo virus (PTV).

SUMMARY

Native sequence of *gag* gene from human immunodeficiency virus (HIV) was used to express in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants and also in *E. coli*. Two versions of chimeric *gag* gene (*gag-ENV* and *gag-RT*) were expressed independently. According to the expression analysis the messenger RNA from chimeric versions of *gag* gene was detected in tomato leaves and fruit tissues. However, we did not detect expression of the whole Gag protein in tomato plants, although the antibody did detect the p24 capsid domain expression in two transformed lines of Gag-ENV. During HIV expression in mammalian cells the late genes such as *gag* promote instability of viral RNA messengers, and this could also be happening in plant tissues. Gag itself is able to originate viral-like particles (VLPs)

of HIV when is expressed in heterologous systems, such as *E. coli* and yeast. In this report, Gag-RT and Gag-ENV constructs were expressed in *E. coli* to confirm if chimeric proteins Gag-RT and Gag-ENV are able to assembly into viral like particles. Expression of these constructs yielded moderate levels in *E. coli* (2 mg L⁻¹ of Gag-RT and 4 mg L⁻¹ of Gag-ENV) of purified chimeric proteins. Electron microscopy studies showed the presence of viral-like particles in cytoplasm of *E. coli* cells expressing Gag-ENV protein, thus indicating that addition of the epitopes did not interfere with proper assembly of Gag in bacterial cells.

Index words: *Lycopersicon esculentum* Mill., genetic transformation, Gag (HIV-1), viral-like particles (VLPs).

INTRODUCCIÓN

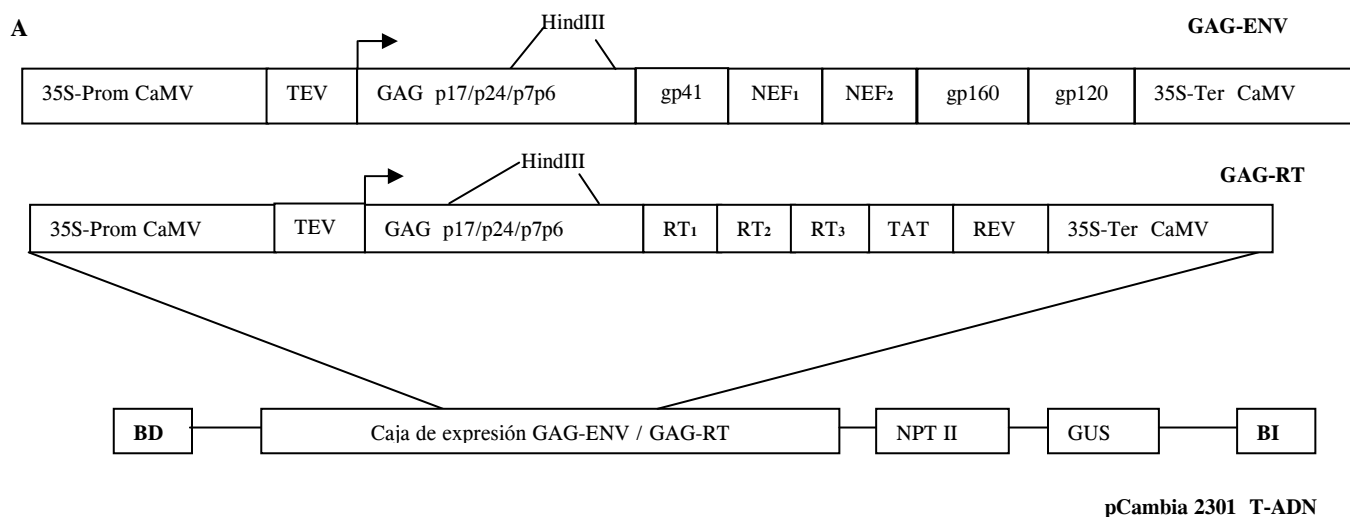
Las plantas han demostrado tener muchas ventajas como sistemas de producción de antígenos recombinantes y proteínas biofarmacéuticas (Gómez Lim, 2007). El objetivo final es su empleo como vacunas, ya sea de forma oral o parenteral. Se han producido más de 150 antígenos de diferentes orígenes, entre ellos algunos del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Webster *et al.*, 2005). La proteína Gag del VIH es la proteína estructural mayoritaria responsable del ensamblaje viral y de la formación de partículas tipo virus (PTV), que posee los dominios de la matriz p17, de la cápside p24 y de la nucleocápside p7 y p6. Las PTV son estructuras proteínicas esféricas que semejan un virus inmaduro, y son altamente inmunogénicas. Al ser antígenos producidos en su forma nativa, son más eficazmente reconocidos por el sistema inmunológico (Luo *et al.*, 1998; Young *et al.*, 2006; Noad y Roy, 2003). Las plantas pueden producir PTV de virus como el de la hepatitis B, el virus Norwalk, el rotavirus y el virus del papiloma humano (Gómez Lim, 2007). Aún no hay evidencia de que la proteína Gag del VIH pueda formar PTV en tejidos vegetales. Además, aunque se ha expresado el dominio de la cápside p24 de VIH de forma

independiente en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) no se ha intentado la expresión en plantas de la proteína Gag completa (matriz, cápside y nucleocápside). El objetivo del presente trabajo fue generar plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) que expresaran el gen *gag* nativo completo, fusionado a una serie de epítomos de otros genes del VIH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de plásmidos y transformación genética de tomate. Los genes quiméricos *gag-ENV* y *gag-RT* (1700 pares de bases) fueron provistos por el Dr. C. Yong Kang de la Universidad Western Ontario, Canadá (Figura 1A). Varios epítomos de otras proteínas del VIH fueron fusionados al gen *gag* en fase para originar dos genes quiméricos: *gag-RT*, que posee regiones de la transcriptasa reversa viral; y *gag-ENV*, que posee secuencias de las proteínas de la envoltura viral (Figura 1A). En ambos casos se espera una proteína de 63 kDa (Figura

1B). Ambos genes fueron transferidos al vector binario pCambia 2301 mediante la subclonación en sitios *Bam*HI. El vector pCambia 2301 posee un T-ADN con dos cajas de expresión, una que confiere resistencia al antibiótico kanamicina y otro que corresponde al gen reportero *uidA*, que codifica para la proteína β -glucuronidasa para detección histoquímica. Para dirigir la expresión del gen *gag* (VIH-1) en las células de tomate, se empleó el promotor constitutivo 35S y la secuencia de poliadenilación del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), también se empleó una secuencia amplificadora (“enhancer”) traduccional del virus del jaspeado del tabaco (TEV). La transformación de tomate cultivar ‘TA234’ (donado por Steve Tanksley, Universidad de Cornell, EE. UU.), se desarrolló de acuerdo con la metodología descrita por Gutiérrez-Ortega *et al.* (2005). El manejo de las plantas transgénicas generadas en el presente trabajo se hizo en condiciones de invernadero, según las normas empleadas rutinariamente en el centro de investigación.



B

GAG-ENV		GAG-RT	
Epítopo	Secuencia	Epítopo	Secuencia
gp41 (aa 843-851)	IPRRIRQGL	RT1 (aa 309-317)	ILKEPVHGV
NEF1 (aa 92-100)	KEKGGLDGL	RT2 (aa 171-190)	FRKQNPDIVIYQYMDDLIVG
NEF2 (128-137)	TPGPGVRYPL	RT3 (aa 158-166)	AIFQSSMTK
gp160 (584-593)	ERYLKDOOLL	TAT (aa 2-11)	EPVDPRLEPW
gp120 (30-46)	AAENLWVTVYGVVWK	REV (aa 67-75)	PAEPVPLQL

Figura 1. Esquema de las construcciones *gag-ENV* y *gag-RT*. Panel A: T-ADN del vector binario pCambia 2301. En este vector se clonaron las cajas de expresión con las fusiones *gag-ENV* y *gag-RT*. Panel B: Descripción de la secuencia y el orden de los epítomos de VIH en las fusiones *gag-ENV* y *gag-RT*; en ambos casos se espera una proteína de 63 kDa.

Escrutinio de plantas transformantes. Las plantas obtenidas se seleccionaron por la actividad de la neomicina fosfotransferasa II por ELISA mediante un paquete comercial (AGDIA) y por tinción histoquímica en hojas jóvenes en busca de actividad de β -glucoronidasa mediante incubación a 37 °C durante 18 h con el sustrato X-Gluc (Figura 2). La presencia del T-ADN se verificó por PCR con los iniciadores directo 5'-ATGGGTGCGAGAGCG-3' y reverso 5'-TTGTGACGAGGGGTC-3', que amplifica un fragmento del gen *gag* de 1.5 Kb. Las condiciones de la reacción fueron 95 °C de desnaturalización por 70 s, 50 °C para alineamiento durante 90 s, y 72 °C de extensión por 70 s, durante 35 ciclos. Los productos de amplificación se analizaron en gel de agarosa a 1 %.

Análisis por hibridación tipo Southern blot, Northern blot e inmunodetección. El número de inserciones del T-ADN se determinó por *Southern blot* en ADN genómico extraído de hojas jóvenes, como describen Peña Ramírez *et al.* (2007), con marcaje radioactivo. El ensayo de detección de los transcritos en tejido de hoja y fruto de tomate se hizo mediante *Northern blot* también de acuerdo con Peña Ramírez *et al.* (2007). El ADN genómico se extrajo de acuerdo con Doyle y Doyle (1987), y el ARN se extrajo con el empleo del Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen). Después de la hibridación se removió la sonda con el gen *gag* y la membrana se hibridó con una sonda específica para ARN ribosomal 28S como control de carga. La extracción de proteínas totales y la inmunodetección también se realizaron de acuerdo con Peña Ramírez *et al.* (2007). Como control positivo se emplearon proteínas del virus purificadas de bacterias, como se describe en seguida.

Expresión y purificación de las proteínas Gag-ENV y Gag-RT en *E. coli*. Los genes *gag-ENV* y *gag-RT* se expresaron en *E. coli* mediante el uso del vector de expresión para *E. coli*, pTrcHIS (Invitrogen) que posee una etiqueta de seis histidinas para facilitar la purificación de la proteína recombinante. La expresión y purificación se hizo mediante la columna de níquel His-GraviTrap (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proteínas purificadas se analizaron por electroforesis de proteínas SDS-PAGE.

Cuantificación de proteínas mediante "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA). Para determinar el rendimiento de las proteínas recombinantes en *E. coli* y en extractos de plantas transgénicas se utilizó la

técnica ELISA. En una placa de titulación de ELISA (Costar) se cargaron concentraciones conocidas (de 3.9 ng a 1 μ g) de la proteína 6xHIS-p24 cápside de Gag purificada, mediante una columna de níquel. Para estimar las concentraciones de las fracciones eluidas de Gag-RT y Gag-ENV a cada pozo se agregaron 100 μ L de extractos proteicos, calentados a 95 °C por 5 min, así como proteína sin calentar. Igualmente, 100 μ L de extracto de proteínas de las plantas transgénicas se agregaron por triplicado en la placa. Las proteínas se dejaron fijando toda una noche a temperatura ambiente. Luego de bloquear con albúmina de suero bovino (BSA) a 5 %, se agregó el anticuerpo primario desarrollado en ratón anti-p24 en una dilución 1/250 durante 2 h y se lavó tres veces con buffer de fosfato salino (PBS)-Tween 20 a 0.05 %, para posteriormente añadir el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa en dilución 1/3000, y se incubó a 37 °C durante 2 h. Luego de los lavados se hizo la detección con el sustrato ortofenilendiamina (OPD), se neutralizó la reacción con ácido sulfúrico 1 N, y se leyó la absorbancia a 490 nm.

Localización de PTV en *E. coli* por microscopía electrónica. Para comprobar si las proteínas quiméricas Gag-ENV y Gag-RT formaban PTV en el citoplasma de *E. coli*, se crecieron cultivos bacterianos con los genes *gag-RT* y *gag-ENV*, en condiciones normales y de inducción, y se fijaron con glutaraldehído a 2.5 % en buffer de fosfatos pH 6.8. Las células fijadas se empaquetaron con agarosa y se incubaron en tetróxido de osmio a 2 %. El material así obtenido fue infiltrado y embebido con el paquete de resina epoxy (Electron Microscopy Sciences), para después obtener secciones ultrafinas. Posteriormente, los cortes se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo antes de ser observados al microscopio electrónico Philips Morgagni 268, con aumentos de 56 Kx a 80 KV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de emplear versiones quiméricas de la proteína Gag fusionada a epítopos de proteínas del VIH, es aumentar la respuesta inmunológica hacia éstos al aprovechar la capacidad de Gag para formar estructuras conocidas como partículas tipo virus (PTV). En el presente trabajo se generaron plantas transgénicas de tomate que expresaron los genes quiméricos *gag-ENV* y *gag-RT*.

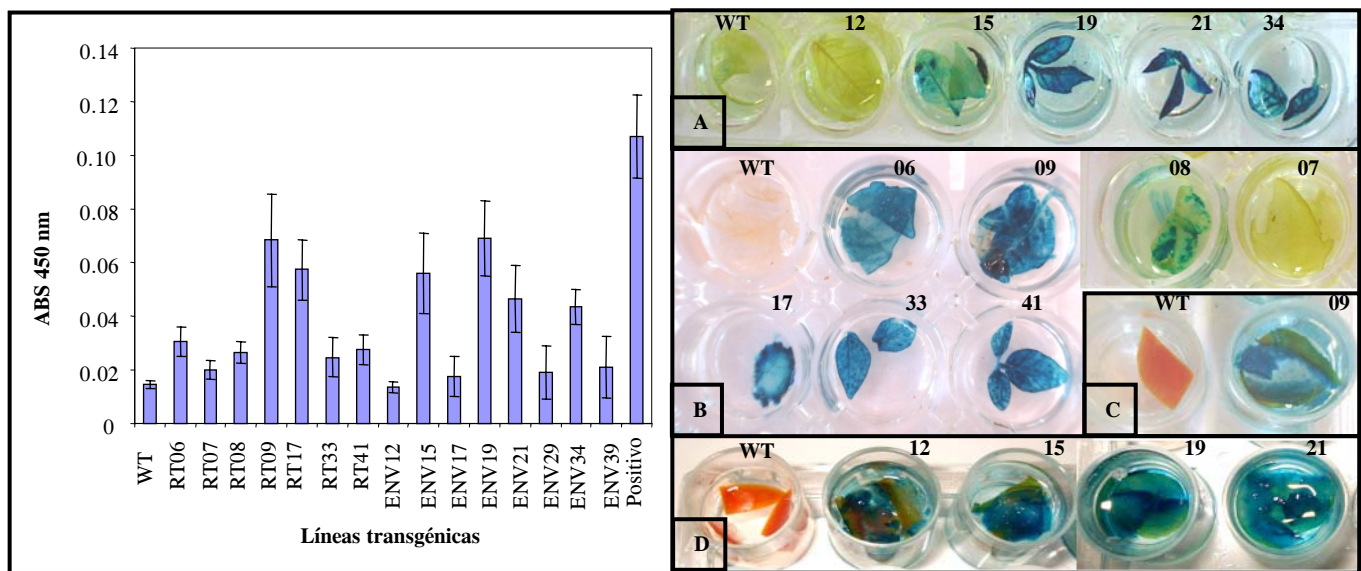


Figura 2. Escrutinio de plantas transgénicas de tomate por ELISA de NPTII y tinción histoquímica para GUS. Izquierda: ensayo de ELISA en 15 plantas de tomate, siete líneas de Gag-RT y 8 de Gag-ENV; se cargaron 100 µg de extracto de proteína de hojas, se usó una planta silvestre (WT) como testigo negativo y 20 µg de la proteína NPTII como control positivo. Derecha: tinción GUS en tejidos de hoja y frutos. Panel A: Los números representan las líneas de Gag-ENV (hoja). Panel B: siete líneas de Gag-RT (hoja). Panel C: Gag-RT 9 (fruto). Panel D: cuatro líneas Gag-ENV (fruto); como testigos se emplearon explantes de plantas sin transformar (WT).

Transformación genética de tomate. Se obtuvieron un total de siete líneas transformantes con la construcción Gag-RT y ocho líneas para Gag-ENV. El análisis de las plantas de la generación T0 mediante PCR, ELISA para NPT II y tinción histoquímica (Figuras 2, 3 y 4), permitió la selección de las líneas RT 09, RT 17, RT 33, RT 41, ENV 15, ENV 19 ENV 21 y ENV 34. Mediante *Southern blot* se determinó que seis líneas poseen una sola inserción (RT 17, RT 41, ENV 12, ENV 15, ENV 19 y ENV 21), y dos de ellas (ENV 34 y RT 9) poseen dos inserciones en su genoma (Figura 4). Sólo las líneas ENV 15, ENV 21, RT 9 y RT 17 produjeron semillas en sus frutos, aunque las semillas de las líneas RT 17 y ENV 21 resultaron inviables, a diferencia de las líneas RT 9 y ENV 15 que generaron semillas viables que lograron germinar en medio selectivo que contenía kanamicina. Con el análisis *Southern blot* de las plantas de la progenie se comprobó, que en la progenie de las líneas Gag-ENV 15 y Gag-RT 9, el T-ADN está presente en copia única (Figura 5).

Expresión de los transgenes de gag-ENV y gag-RT en tomate e inmunodetección. Por Northern blot se detectó la expresión de los transgenes en hojas de las líneas ENV 15, ENV 19, ENV 34 y ENV 21; esta última línea exhibió la señal más fuerte (Figura 6A). En hojas de las líneas RT 6, RT 9 y RT 17 también se pudo detectar ex-

presión del transgen *gag-RT* (Figura 6B). Sin embargo, los frutos de las líneas RT 17 y ENV 34 no mostraron expresión de *gag*, a pesar de que el transgen es detectable en las hojas de estas mismas plantas (Figura 6C).

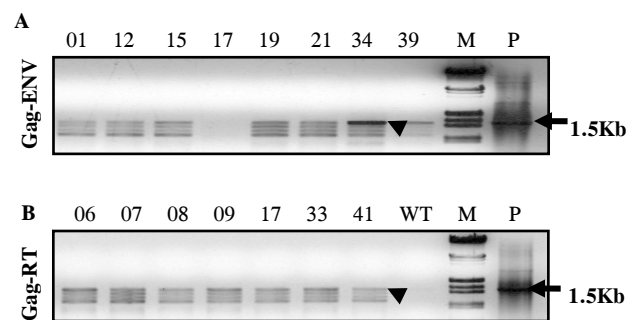


Figura 3. Amplificación por PCR en plantas transgénicas de tomate, para la detección del T-ADN. Se usaron los iniciadores directo 5'-ATGGGTGCGAGAGCG-3' y reverso 5'-TTGTGACGAGGGGTC-3', que reconocen el gen *gag* (VIH-1) y generan un producto de 1.5 Kb (indicada por flechas). Panel A: ocho líneas de Gag-ENV. Panel B: siete líneas de Gag-RT. En ambos paneles los números en la parte superior representan las líneas transformadas. Como marcador de referencia (M) se empleó ADN de Lambda digerido con *HindIII* y *EcoRI*; el control positivo se generó por amplificación de ADN del plásmido pCambia2300:Gag-ENV, y ADN de una planta sin transformar como testigo negativo (WT).

Para verificar que la proteína de 63 kDa se expresaba en estas líneas, se realizó una inmunodetección. Al utilizar un anticuerpo específico para p24 y proteínas extraídas de fruto, no se logró detectar la proteína completa de 63 kDa en tomate, pero los anticuerpos sí detectaron una banda de aproximadamente 26 kDa que es muy similar en tamaño al dominio p24 de Gag (Figura 7, panel A). No obstante, esta banda solamente se observó en las líneas Gag-ENV 15 y Gag-ENV19.

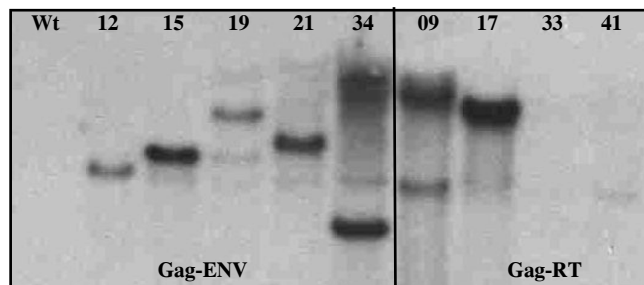


Figura 4. Ensayo por hibridación tipo Southern blot. Determinación del número de inserciones del T-ADN en el genoma de las líneas de tomate transformantes Gag-ENV (izquierda) y Gag-RT (derecha). Se digirieron 25 μ g de ADN genómico de hoja de cada línea (representadas por los números en la parte superior), con la enzima de restricción *EcoRI* que reconoce un sólo sitio en el T-ADN, y como sonda de detección se empleó una región extraída del gen *gag* con la enzima *HindIII* (Figura 1A).

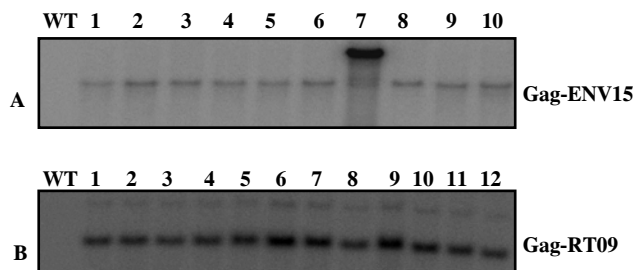


Figura 5. Análisis de la progenie de las líneas transformadas de tomate mediante Southern blot. Se analizaron plantas germinadas en medio selectivo que contenía kanamicina (100 mg L^{-1}). Para detectar el T-ADN, se digirieron 30 μ g de ADN genómico con la enzima de restricción *EcoRI* de diez plantas provenientes de la línea Gag-ENV 15 (Panel A, carriles de 1-10) y doce plantas de Gag-RT 9 (Panel B, carriles de 1-12). Como sonda se empleó un segmento del gen *gag*.

Expresión de *gag* en *E.coli*. En paralelo se expresaron las proteínas quiméricas Gag-ENV y Gag-RT en *E. coli*, para después ser detectadas por el anticuerpo anti-p24 de Gag (Figura 7E). Ambas proteínas fueron purificadas y cuantificadas mediante titulación en placa de ELISA al emplear como control a la proteína pura de la cápside 6xHIS-p24 (VIH-1) para generar la curva estándar

(Figura 7D). A partir de la cuantificación se estimó un rendimiento de 2.25 mg L^{-1} para la proteína Gag-RT y de 3.95 mg L^{-1} para Gag-ENV, ambas expresadas en *E. coli*. En la misma placa de titulación se cargaron 100 μ g de tejido de fruto de las líneas transgénicas RT 9, ENV 15 y ENV 19, pero no se detectó señal (Figura 8). Al analizar en microscopio electrónico las células de *E. coli* que expresaban la construcción Gag-ENV, y se encontraron estructuras icosaédricas refringentes en las inmediaciones de la membrana plasmática de las bacterias, de un tamaño estimado de 40 a 60 nm (Figura 9), mientras que en bacterias que contenían el transgen sin inducir no se observaron estas estructuras. Esto demostró que la modificación de la proteína Gag, que posee 55 aminoácidos adicionales en su extremo carboxi-terminal (Gag-ENV), no afectó su capacidad de formar PTV.

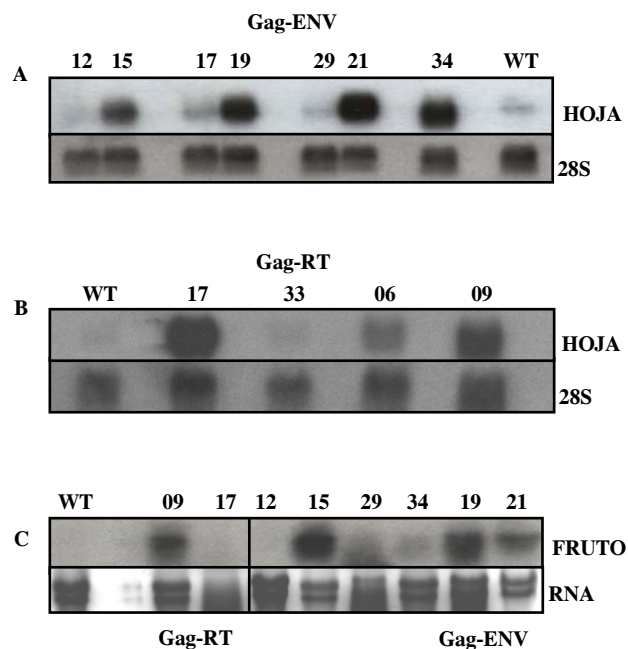


Figura 6. Análisis de la expresión del ARN mensajero de *gag-RT* y *gag-ENV* mediante ensayo de Northern blot. Panel A: hibridación con ARN total de hoja de siete líneas transformadas de tomate de Gag-ENV. Panel B: hibridación de cuatro líneas transformadas Gag-RT. En A y B como control de carga se hibridó con una sonda específica para ARN ribosomal 28S. Panel C: hibridación con ARN de frutos de dos líneas transformantes de Gag-RT y seis líneas de Gag-ENV. Se incluye una foto del gel con ARN aislado de estas líneas, teñido con bromuro de etidio (0.5 μ g mL^{-1}). Se empleó la misma sonda que para la hibridación Southern blot. En todos los casos, como control negativo se cargó en la membrana ARN de una planta de tomate sin transformar (WT). Los números en la parte superior indican las líneas transformadas.

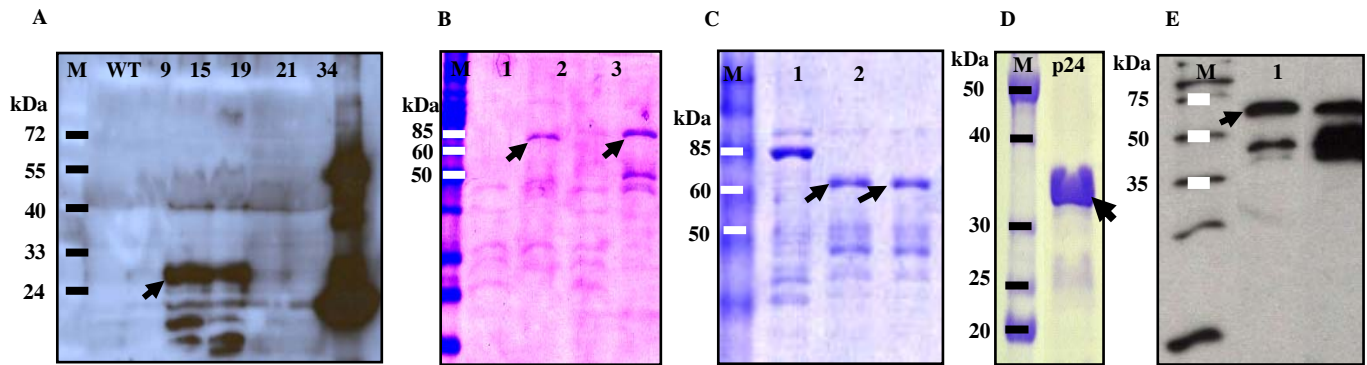


Figura 7. Inmunodetección de Gag (VIH-1) en frutos de las líneas transformadas de tomate y *E. coli* por ensayo de Western Blot. Panel A: inmunodetección de Gag en plantas, con 200 μ g de extracto de proteínas de fruto de las líneas Gag-RT 9 y Gag-ENV 15, 19, 21 y 34 (como se indica por números en la parte superior). Las plantas Gag-ENV 15 y 19 muestran señal para la expresión de p24 (flecha), detectadas con un anticuerpo anti-p24 (dilución 1/1000). Como testigo positivo (P) se emplearon las proteínas de VIH expresadas en células SF9 (Baculovirus) obsequiada por el Dr. C. Yong Kang. Como control negativo se incluyó una planta sin transformar (WT). En los paneles B, C y D se muestran tinciones de proteínas totales por azul de Coomassie, de purificaciones de las proteínas Gag-ENV (Panel B, línea 2 y panel C líneas 2 y 3), y Gag-RT (panel B línea 4), indicadas por flechas. En el panel D se indica con una flecha la proteína purificada de la cápside de Gag (p24) fusionada a la etiqueta de seis histidinas, con un peso molecular de 36 kDa. Panel E, las flechas muestran la inmunodetección de las proteínas Gag-RT línea 1 y Gag-ENV línea 2; la detección se realizó con anticuerpo anti-p24 (1/1000).

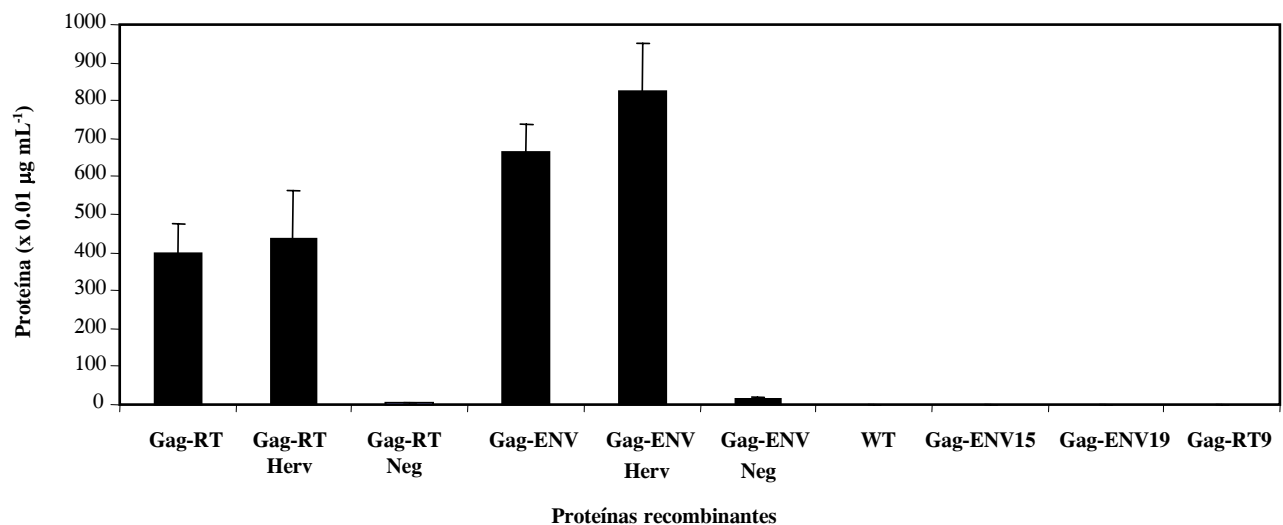


Figura 8. ELISA para la estimación de rendimientos de las proteínas Gag-RT y Gag-ENV en *E. coli*. La concentración de las proteínas se estimó con una curva estándar de proteína purificada 6xHIS-p24 (concentraciones de proteína de 1 μ g a 3.9 ng). Se cargaron tres tratamientos de cada construcción, proteína Gag-RT, Gag-RT desnaturalizada (Herv) y Gag-RT Negativo (Neg). Igualmente se incluyeron en la placa de titulación 100 μ g de proteínas de un extracto de fruto de las líneas ENV 15, ENV 19 y RT 9, comparadas con una planta sin transformar (WT).

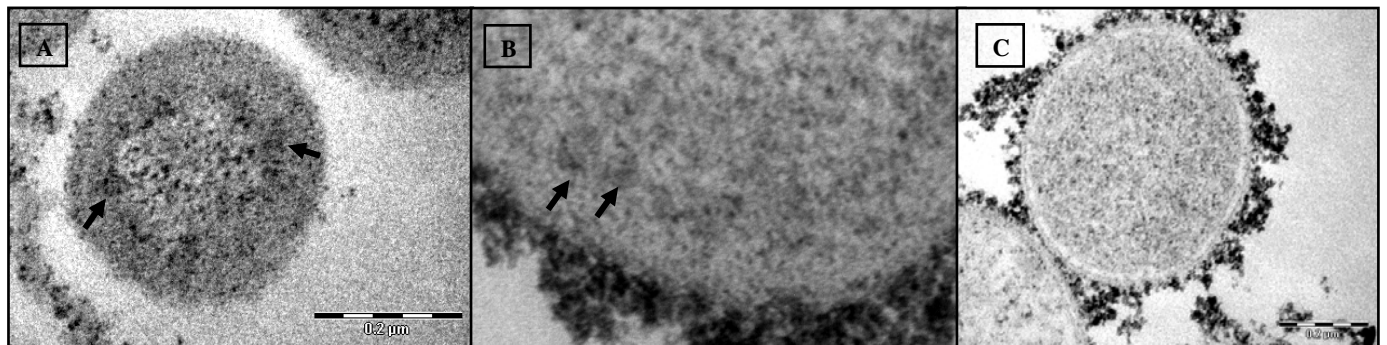


Figura 9. Micrografías electrónicas de Gag (VIH-1) expresada en *E. coli*. La proteína recombinante Gag-ENV producida en el citoplasma de *E. coli* se muestra en las micrografías A y B. Las flechas indican estructuras esféricas PTV de 40-60 nm de diámetro, próximas a la membrana plasmática. Como testigo negativo se emplearon bacterias sin inducir, que no muestran estas estructuras (C).

Las plantas representan una alternativa atractiva para producir y presentar antígenos al sistema inmune. Recientemente se postuló que en el caso del VIH las plantas podrían ser particularmente útiles para estos mismos fines (Webster *et al.*, 2005). Se han logrado producir algunas proteínas del VIH en plantas, entre ellas algunos dominios del gen *gag* (Zhang *et al.*, 2002; Webster *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2006), y en este trabajo se buscó expresar por primera vez en plantas a la proteína Gag completa (matriz, cápside y nucleocápside). A la fecha no existe reporte previo de la expresión del gen *gag* completo en un sistema vegetal.

Usualmente en células animales el mensajero de *gag* se encuentra en el núcleo celular. Aunque se logró detectar el mensajero en los tejidos de la planta, no se pudo detectar la proteína completa de 63 kDa. Sin embargo, los anticuerpos empleados en este trabajo eran específicos para p24 y sí detectaron una banda de aproximadamente 26 kDa, muy similar en tamaño al dominio p24 de Gag. La pequeña diferencia en el peso molecular (24 vs. 26 kDa) probablemente se deba a una glucosilación en la célula vegetal. Se sabe que las plantas pueden glucosilar proteínas heterólogas con diversos carbohidratos (Faye *et al.*, 2005), los cuales pueden alterar la movilidad de las proteínas en geles.

Normalmente, todos los retrovirus como el VIH, después de ser liberados de las células infectadas son procesados por la proteasa viral (PR) y originan varios polipéptidos independientes. En el caso del VIH la PR origina el polipéptido p24 (Scarlatá y Carter, 2003). Debido a que en las células vegetales existen cientos de proteasas de diferentes tipos (van der Hoorn, 2008), se puede postular la acción de alguna proteasa de la planta que procese el polipéptido Gag y origine el dominio p24, que se puede traducir sin problemas en células vegetales (Zhang *et al.*, 2002). *Gag* es un gen de expresión tardía, debido a que el mensajero posee un dominio de localización nuclear en la región p17 (dominio de la matriz), que lo conduce a esta localización. Por ello, aquí se postula que este mecanismo podría afectar la traducción de la proteína Gag completa (63kDa) en los tejidos de tomate analizados. Además, en trabajos con células animales se ha demostrado que varios transcritos del VIH (entre ellos *gag*) son inestables, lo que reduce la eficiencia de traducción (Gao *et al.*, 2003). Quizás el sustituir los codones en la secuencia de *gag* por otros de plantas ayudaría a mejorar la estabilidad, aunque esto no siempre funciona (Gómez Lim, 2007). Se postula entonces que probablemente las fusiones de epítomos de alguna manera altera la capacidad de Gag de originar PTV y esto impide se expresen en células vegetales. No obstante, la observación al microscopio electrónico de

PTV en células de *E. coli* que expresaban la proteína quimérica Gag-ENV (Figura 8), confirmó que la fusión con los epítomos no altera de manera significativa la capacidad de la proteína para formar PTV, y que la falta de detección de la proteína en las células vegetales se debió a otras causas.

Un resultado interesante fue que en algunas líneas las plantas produjeron semillas inviables. En este laboratorio ya se había observado que durante la expresión de TAT (VIH-1) en plantas de tomate se producían frutos sin semillas, pero aún en ese caso sí se pudo detectar expresión de la proteína (Peña Ramírez *et al.*, 2007). La razón de este efecto fenotípico es desconocida. El objetivo original era expresar el gen *gag* en frutos de tomate, observar la formación de PTV en frutos y determinar su actividad inmunológica en animales de laboratorio. La ausencia de la proteína Gag completa en plantas impidió alcanzar a este último objetivo, aunque sí se logró la expresión y acumulación de los mensajeros *gag-ENV* y *gag-RT* en tejidos de tomate.

CONCLUSIONES

Se logró transformar tomate con las genes quiméricos *gag-ENV* y *gag-RT*, y así demostrar que el transgen es heredable a la progenie. Se detectó el mensajero de *gag-ENV* y *gag-RT* en hojas y frutos, pero no se pudo detectar la presencia de la proteína quimérica Gag completa de 63 kDa en tomate; en su lugar fue evidente la presencia en frutos del dominio p24 de la cápside viral en las líneas ENV 15 y ENV 19, aunque con una pequeña diferencia en peso molecular. Para verificar si las versiones quiméricas de Gag eran capaces de originar partículas tipo virus (PTV) aquí se usó el modelo de expresión de *E. coli*. Se expresaron y purificaron eficientemente las proteínas quiméricas Gag-ENV y Gag-RT en *E. coli* con un rendimiento de 4 mg L⁻¹ y 2 mg L⁻¹, respectivamente. Las observaciones al microscopio electrónico permitieron demostrar que la proteína quimérica Gag-ENV es capaz de formar PTV en *E. coli*. A la fecha no se ha reportado estudio alguno de inmunogenicidad con la proteína Gag producida en sistemas vegetales. Debido a que la proteína Gag del VIH-1 es altamente inmunogénica y crucial en la formación de la partícula viral, es importante estudiar la expresión de Gag en sistemas vegetales. Además, se postula que la modificación de las secuencias nativas del virus mediante el empleo de codones preferencialmente usados por las plantas, podría conducir a la mejora en los niveles de acumulación de Gag, y con ello finalmente se podrían generar partículas tipo virus del VIH en una célula vegetal.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaria de Relaciones Exteriores (SRE), por la beca de doctorado otorgada a Alberto J. Donayre T., para la realización del presente trabajo. Al Dr. C. Yong Kang del Instituto Siebens Drake de la Universidad Western Ontario, Canadá (UWO), por proveer los genes *gag-ENV* y *gag-RT* de VIH-1 empleados en el presente estudio. Igualmente se agradece su ayuda para la realización de los ensayos de inmunodetección hechos en el laboratorio de Virología bajo su dirección. A la Q.F.B Aurora Verver y Vargas C., del Laboratorio de Microscopía de Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Campus Guanajuato, y la I.B.Q. María Palma Tirado de la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) - Juriquilla Querétaro, por la ayuda en el procesamiento y montaje de muestras para observaciones al microscopio electrónico.

BIBLIOGRAFÍA

- Doyle J, J L Doyle (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Faye L, A Boulafloous, M Benchanane, V Gomord, D Michaud (2005) Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* 23:1770-1778
- Gao F, L Ying, J Decker, F Peyerl, F Bibollet-Ruche, C Rodenburg, Y Chen, D Shaw, A Zajac, N Letvin, B Hahn (2003) Codon usage optimization of HIV type 1 subtype C *gag*, *pol*, *env*, and *nef* Genes: *In vitro* expression and immune responses in DNA-vaccinated mice. *Aids Res. Human Retrovir.* 19:817-823.
- Gómez Lim M A (2007) Transgenic plants in therapeutically valuable protein production. *Transgenic Plants J.* 1:256-266.
- Gutiérrez Ortega A, C Sandoval Montes, T Olivera Flores, L Santos Argumedo, M Gómez Lim (2005) Expression of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants. *Transgenic Res.* 14:877-885.
- Luo L, Y Li, J Chang, S Cho, T Kim, M Choi, H Cheong, H Kim, H Ahn, M Min, B Chun, S Jung, AS Woo, S Park, Y Kang (1998) Induction of V3-specific cytotoxic T lymphocyte responses by HIV *gag* particles carrying multiple immunodominant V3 epitopes of gp120. *Virology* 240:316-325.
- Noad R, P Roy (2003) Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiol.* 11:438-444.
- Peña Ramírez Y J, E Tasciotti, A Gutiérrez Ortega, A Donayre Torres, M Olivera Flores, M Giacca, M Gómez Lim (2007) Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 Tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 14:685-692.
- Scarlata S, C Carter (2003) Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Bioch. Biophys. Acta* 1614:62-72.
- Webster D, T Merlin, R Pickering, A White, I Dry, P Gorry, S Wesselingh (2005) Is there a role for plant-made vaccines in the prevention of HIV/AIDS? *Immunol. Cell Biol.* 83:239-247.
- Young K, S McBurney, L Karkhanis, T Ross (2006) Virus-like particles: Designing an effective AIDS vaccine. *Methods* 40:98-117.
- van der Hoorn R A (2008) Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59:00-00 (En prensa).
- Zhang G, L Rodrigues, B Rovinski, K A White (2002) Production of HIV p24 protein in transgenic tobacco plants. *Mol. Biotechnol.* 20:131-136.