

MODIFICACIÓN GENÉTICA DE CLOROPLASTOS PARA LA PRODUCCIÓN DE GLUTAMATO DESCARBOXILASA, ANTÍGENO CON POTENCIAL PARA VACUNACIÓN CONTRA DIABETES TIPO 1

Jesús A. Badillo Corona^{ab} y John C. Gray^a

^aUniversity of Cambridge, Department of Plant Sciences, Cambridge, Reino Unido CB2 3EA; ^bUnidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Av. Acueducto s/n, Barrio La Laguna, Col. Ticomán, México, D.F., C.P. 07340, jbadillo@ipn.mx

Palabras clave: *transformación de cloroplastos, diabetes tipo 1, vacunas*

Introducción. La modificación genética de cloroplastos, en comparación con la modificación genética nuclear, tiene varias ventajas; la cantidad de proteínas recombinantes obtenida es mucho mayor ya que se han obtenido niveles de hasta un 70% de la proteína soluble total (1). Además, se ha observado que no se presentan efectos pleiotrópicos y que los niveles de expresión son más consistentes entre las distintas líneas obtenidas. Quizás, la ventaja más importante es que los plastidos están ausentes en el polen de la mayoría de los cultivos de importancia comercial, lo cual serviría como barrera de seguridad para evitar la dispersión de los transgenes (2). La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune, en la cual la disminución en la producción de insulina es el resultado de la destrucción de las células β de los islotes de Langerhans. Esta destrucción es consecuencia de una respuesta inmune humoral y celular dirigida contra la enzima glutamato descarboxilasa en su isoforma de 65 kDa (GAD65). Hay estudios con el modelo murino en los que se demuestra que la administración de GAD antes del inicio de la enfermedad pueden prevenir o retardar la enfermedad (3).

Metodología. Se utilizó un gen quimérico que consiste en la secuencia que codifica para los primeros 87 aminoácidos (aa) de GAD67 de *Rattus norvegicus* fusionada a la secuencia codificante de los aa 88-587 de GAD65 de humanos (región que contiene los epitopos necesarios para desencadenar una respuesta inmune) (4). Para la expresión del gen quimérico *gad65/67* en cloroplastos de tabaco, se construyó el vector pZSJH1*gad* que dirige la inserción de los transgenes a la región *rbcl-accD*. Utilizando micropartículas de tungsteno (M-10 Bio-Rad) se bombardearon hojas de tabaco y se realizaron explantes que se colocaron en medio MS (suplementado con vitaminas B5, 30 g/L sacarosa, 1 mg/L de Bencil aminopurina y 0.1 mg/L de ácido naftalen acético) utilizando espectinomina como agente de selección. Los brotes resistentes a espectinomina fueron utilizados para generar plantas y semillas; posteriormente se realizó un análisis molecular en las plantas obtenidas de éstas.

Resultados y discusión. Se obtuvieron 19 brotes resistentes a espectinomina de los cuales 6 líneas resultaron transplastómicas. En estas líneas se demostró la correcta inserción del transgen entre los genes *rbcl* y

accD mediante Southern blot así como la producción de mensajeros del tamaño esperado. De las 6 líneas transplastómicas se extrajo la proteína soluble total y se realizó un western blot utilizando anti-ratón anticuerpos monoclonales α -GAD. Se detectó una banda en todas las líneas transplastómicas que corresponde a una proteína de peso molecular aparente de 45 kDa (Fig. 1), ausente en el control (extracto de planta silvestre). La proteína obtenida podría ser producto de degradación o una forma truncada de GAD65. Un análisis de la secuencia mostró que existe otro codón ATG en la posición 481, con un sitio de unión a ribosoma 5 nucleótidos río arriba. Debido a que en cloroplastos la traducción de mensajeros policistrónicos es posible, la proteína detectada de 45 kDa podría ser el resultado de una traducción desde este codón de inicio alternativo.

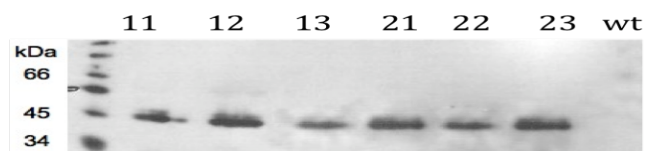


Figura 1. Western blot de diferentes líneas transplastómicas de tabaco expresando el gen quimérico *gad65/67*.

Conclusiones. La modificación genética de cloroplastos de tabaco fue eficiente al utilizar el vector pZSJH1*gad* para la expresión del gen quimérico *gad65/67*. Se observó la presencia de una forma truncada de GAD65 (peso molecular aparente de 45 kDa).

Agradecimientos. El presente trabajo fue llevado a cabo con financiamiento de la Comunidad Europea como parte del Framework 6 y del consorcio Pharma-Planta. JABC fue becario CONACYT durante el desarrollo de la investigación.

Bibliografía. 1. Oey, M. *et al.* (2009). Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant J.* 57, 436-445.

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

3. Tian, J.D. *et al.* (1996). Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes. *J. Exp. Med.* 183:1561-1567.

4. Avesani, L. *et al.* (2003). Improved *in planta* expression of the human islet autoantigen glutamic acid decarboxylase (GAD65). *Transgenic Res.* 12:203-212.