

PRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO p24 DEL VIH-1 MEDIANTE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA DE CLOROPLASTOS DE LECHUGA (*Lactuca sativa*).

Luis Andrés Lara Martínez, Claudio Garibay Orijel y Jesús Agustín Badillo Corona.

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Av. Acueducto s/n, Barrio La Laguna, Col. Ticomán, México, D.F., C.P. 07340, jbadilloc@ipn.mx

Palabras clave: *Lactuca sativa*, transplastoma, vectores plásticos

Introducción. La expresión de genes exógenos mediante la modificación genética de cloroplastos, permite la obtención de una gran cantidad de proteínas recombinantes. Este tipo de modificación carece de efectos pleiotrópicos y epigenéticos, además de que el costo de producción es bajo y el escalamiento es sencillo [1]. Sin embargo, la modificación genética de cloroplastos sólo es rutinaria en la planta del tabaco, la cuál, tiene el problema de generar toxinas que aumentarían el costo de recuperación de la proteína recombinante. Por lo tanto, es necesario extender la tecnología a otras especies como lechuga (*Lactuca sativa*) ya que no contiene compuestos tóxicos y además, es comestible [2] por lo que puede funcionar como un sistema de entrega de nutraceuticos y/o farmacéuticos tales como el antígeno p24 del VIH-1 que ha sido probado como vacuna experimental en fase clínica por su capacidad de montar respuesta de linfocitos citotóxicos [3].

El objetivo del trabajo es diseñar vectores que sean especie específicos para la generación de plantas transplastómicas estables de lechuga. Para ello se plantean diferentes estrategias para la construcción de vectores que permitan maximizar los niveles de expresión de genes exógenos en lechuga.

Metodología. Para la construcción de vectores específicos se analizó la secuencia del plastoma de lechuga (Genbank; número de acceso AP007232); posteriormente se diseñaron primers específicos para los sitios de inserción objetivo (*trnI* y *trnV*) y para los promotores y terminadores especie-específicos a utilizar (*Prrn* y *TrbcL*) en los vectores de expresión. En cuanto al antígeno p24 del VIH-1, se realizó la escisión del mismo a partir del vector pZSJH1p24 [3]. La secuencia codificante de p24 se insertó en los vectores generados que contienen el casete de expresión del marcador de selección; los promotores usados contienen diferentes regiones 5' UTR; (i) el 5' UTR del gen *rbcL* con un sitio de unión a ribosoma sintético, (ii) el 5' UTR del gen 10 del bacteriófago T7 (T7g10) y (iii) el 5' UTR T7g10 + 15 nucleótidos [3, 4]. El cassette de expresión del gen de selección contará con regiones *lox* flanqueantes para su posterior remoción y se insertará en contraposición al cassette de p24 para evitar deleciones y recombinaciones heterólogas [4] (Fig. 1).

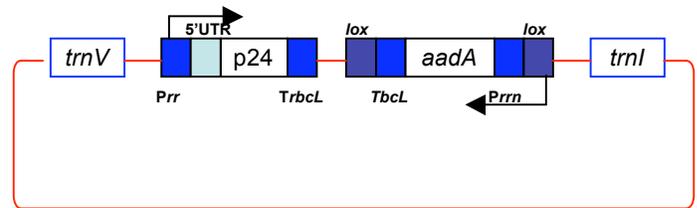


Fig. 1. Esquema del vector.

Resultados y discusión. La modificación genética de cloroplastos es una herramienta rutinaria sólo en la planta del tabaco; en las demás especies aún está en desarrollo. Se sabe que la variación del genoma del cloroplasto entre especies es mínima, por lo que se ha intentado en numerosas ocasiones usar los mismos vectores diseñados para la planta del tabaco con el fin de transformar otras especies; sin embargo, la mayoría de las veces no se han obtenido resultados óptimos. Por lo cuál, es necesario producir vectores especie-específicos y con ello, la obtención de plantas transplastómicas estables. Además, es de considerarse que los niveles de expresión, en contraposición a aquellos observados en tabaco, han sido bajos [2]; con lo cuál surge la necesidad de buscar alternativas para mejorar los elementos que controlan los niveles de expresión. En la planta del tabaco, una estrategia aplicada ha sido variar la región 5'UTR dando lugar a rendimientos más altos; por lo que esperamos que al utilizar esta estrategia, se incrementen los niveles de expresión hasta ahora obtenidos en lechuga.

Conclusiones. Al momento, se han diseñado los primers y se ha planteado una estrategia de clonación para la construcción de vectores especie-específicos *in silico* para la transformación de *Lactuca sativa*.

Bibliografía.

- Maliga P. (2004). Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.*;55:289-313.
- Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, Okumura S, Takase H, Hattori M, Yokota A, Tomizawa K. (2006) Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Res.* 15:205-17.
- Zhou F, Badillo-Corona JA, Karcher D, Gonzalez-Rabade N, Piepenburg K, Borchers AM, Maloney AP, Kavanagh TA, Gray JC, Bock R. (2008) High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant Biotechnol J.* 6: 897-913
- Lutz KA, Maliga P. (2007) Construction of marker-free transplastomic plants. *Curr Opin Biotechnol.* 18:107-14.