

CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR DE VIRUS DE PLANTA PORTANDO UNA SECUENCIA MUTAGENIZADA DEL GEN *NEF* DEL HIV-1

CONSTRUCTION OF A VECTOR OF PLANT VIRUS CARRYING
A MUTAGENIZED SEQUENCE OF HIV-1 *NEF* GENE

por

ARNALDO M. NOGUERA A.¹

¹ Ingeniero Agrónomo, Candidato a Doctor en Biología Celular, Profesor Instructor,
Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

a.noguera@ula.ve

RESUMEN

Los vectores de virus de plantas representan una alternativa excelente como sistema de expresión de proteínas heterólogas, especialmente de biofármacos y vacunas multicomponentes. Diferentes antígenos del HIV-1 han sido expresados exitosamente en plantas a través de sistemas de transformación estable o expresión transitoria. Dentro del grupo de proteínas que componen el virión del HIV, Nef es considerada un blanco promisorio para la formulación de vacunas debido al papel que desempeña durante los primeros pasos de la infección viral. En el presente trabajo se reportan los resultados de la construcción de una quimera viral portando una secuencia modificada del gen *nef* del HIV-1. Se introdujeron dos sustituciones puntuales en los sitios reconocidos por las enzimas de restricción *XhoI* y *KpnI* utilizando la técnica de amplificación por PCR. Con este propósito se emplearon dos cebadores mutagénicos y dos silvestres en tres rondas de amplificación por PCR para cada sustitución. Los amplicones portadores de la doble mutación fueron ligados al vector de expresión viral pTMV30B-GFPC3, y se multiplicaron por transformación en células de *E. coli* XL1-blue; los cuales fueron posteriormente purificados y analizados por digestión y secuenciación. Los productos de la transcripción *in vitro* de esta quimera se inocularon en plantas de *Nicotiana benthamiana*, y la infectividad de los transcriptos se validó por sintomatología y RT-PCR. Los resultados demostraron que la quimera viral construida produjo transcriptos infectivos capaces de inducir síntomas característicos en las plantas inoculadas; lo cual abre la posibilidad para desarrollar una vacuna anti-HIV producida en plantas.

PALABRAS CLAVE: Infectividad; mutagénesis sitio-dirigida; quimera viral; transcripción *in vitro*; virus de inmunodeficiencia humana.

ABSTRACT

The vectors of plant virus represent an excellent alternative as expression system of heterologous proteins especially of biopharmaceuticals and multicomponent vaccines. Different HIV-1 antigens have successfully been expressed in plants through stable transformation systems or transitory expression. Among the proteins group that compound the HIV virion, Nef is considered a promising target to vaccine formulation due to the role it develops during the first viral infection steps. In the present study, the results of the construction of a viral chimera carrying a modified sequence of HIV-1 *nef* gene are reported. Two puntual substitutions were introduced in the sites recognized by the *XhoI* and *KpnI* restriction enzymes using the amplification technique by PCR. With this purpose, two mutagenic and two wild primers were used in three amplification rounds by PCR for each substitution. The amplicons carrying the double mutation were linked to the pTMV30B-GFPC3 viral expression vector and were multiplied by transformation in *E. coli* XL1-blue cells, which were purified and analyzed later by digestion and sequencing. The *in vitro* transcription products of this chimera were inoculated in *Nicotiana benthamiana* plants, and the infectivity of the transcripts was validated by sintomatology and RT-PCR. The results showed that the constructed viral chimera produced infectious transcripts capable to induce characteristic symptoms in inoculated plants which opens the possibility to develop an anti-HIV vaccine produced in plants.

KEY WORDS: Infectivity; site-directed mutagenesis; viral chimera; *in vitro* transcription; human immunodeficiency virus.

INTRODUCCIÓN

El virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (*Human immunodeficiency virus*, HIV-1) expresa proteínas estructurales (Env, Gag), enzimática (Pol), regulatorias (Tat, Rev) y accesorias (Nef, Vif, Vpr, Vpu); de las cuales el último grupo son prescindibles para la infección y replicación viral, pero son esenciales para la progresión de la enfermedad hacia SIDA en el hospedero susceptible (Yang & Gabuzda 1998; Flint & Enquist 2004; Carter & Saunders 2007; Malim & Emerman 2008; Dubé *et al.* 2010; Terrán-Angel *et al.* 2016).

Dentro del conjunto de las proteínas accesorias, Nef ha recibido especial atención por su notoria capacidad para modular la respuesta inmune del hospedero y afectar su actividad biológica. Esta es una proteína miristoilada que posee una masa molecular entre 25 y 35 kDa (Shugars *et al.* 1993; Geyer *et al.* 1999; Geyer & Peterlin 2001), pero a nivel *in vitro* se han expresado dos isoformas predominantes. La primera de ellas una forma de 27 kDa (p27), miristoilada en su extremo N-terminal, dominio a través del cual se encuentra asociada a la membrana celular; y una forma citosólica truncada de 25 kDa (p25) traducida a partir de un segundo codón de inicio y carente de los primeros 18 amino ácidos (Marusic *et al.* 2007). Esta proteína es expresada en las primeras etapas de la infección y desempeña un papel esencial durante todos los estados de desarrollo de la enfermedad; ya que a pesar de ser una proteína pequeña presenta un área superficial relativamente grande que le permite interactuar con múltiples proteínas del hospedero para favorecer la evasión inmune.

Este determinante de patogenicidad multifuncional se puede localizar en el interior de la célula, en donde afecta el tráfico intracelular a través de su interacción con sustratos como las proteínas adaptadoras de clatrina (AP1/2), proteínas asociadas a la proteasa Furina (PACS-1/2) y componentes del transporte endosomal (COP-I) (Roeth & Collins 2006; Malim & Emerman 2008; Salmen *et al.* 2015); también se puede encontrar asociado con la membrana plasmática en cuyo caso altera múltiples vías de señalización, principalmente aquellas relacionadas con el funcionamiento del receptor CD4 y con antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I. Además modula la producción de anión superóxido a través de su interacción con p22-phox, un componente del complejo NADPH-oxidasa (Salmen *et al.* 2010) y la supresión del silenciamiento viral mediado por el complejo Ago2-RISC, el cual es empleado por la célula hospedera durante los eventos de silenciamiento génico post-transcripcional para contrarrestar la infección ocasionada por virus (Aqil *et al.* 2013).

Nef es una proteína que sólo se ha reportado para HIV-1, HIV-2 y lentivirus primates relacionados como el virus de inmunodeficiencia simia (*Simian immunodeficiency virus*, SIV). En humanos o macacos Rhesus infectados con HIV-1 o SIV, se demostró que individuos clasificados como no progresores a largo plazo presentaban alteraciones de este gen (Deacon *et al.* 1995; Tobiume *et al.* 2002). Esta marcada presión selectiva por mantener altamente conservada la secuencia del gen *nef*, ha hecho que esta proteína se convierta en un blanco terapéutico candidato para la formulación de

vacunas que combinen componentes virales tanto estructurales como funcionales. Estudios promisorios del desarrollo de vacunas multi-componentes contra HIV-1, reportan evaluaciones pre-clínicas de una vacuna constituida por las proteínas recombinantes gp120 y la fusión Nef-Tat (Goepfert *et al.* 2007), así como los efectos de una vacuna genética multicomponente combinando antígenos estructurales (Gag/Pol, Env) y regulatorios (Tat, Rev, Nef), esto en un modelo animal macaco-SIV (Maggiorella *et al.* 2007). Por esta razón la respuesta inmune dirigida contra esta proteína viral puede ayudar a controlar los pasos iniciales de la infección por HIV-1 y reducir la carga y la expansión viral (Marusic *et al.* 2001).

Ambas isoformas de Nef (p25 y p27), han sido expresadas en diferentes sistemas biológicos tales como *E. coli* (Azad *et al.* 1994; Salmen *et al.* 2010); levaduras (Sirén *et al.* 2006); células de insectos (Kohleisen *et al.* 1996); y células vegetales a través de estrategias de expresión estable en plantas transgénicas y transitoria utilizando los vectores de virus de plantas (Marusic *et al.* 2007; Avesani *et al.* 2007; Barbante *et al.* 2008; de Virgilio *et al.* 2008; Zhou *et al.* 2008; Lombardi *et al.* 2009; Kagale *et al.* 2012). No obstante, el sistema de expresión transitorio basado en la manipulación de genomas de plantas y virus que infectan plantas, ha resultado el más atractivo en la actualidad por cuanto presenta las siguientes ventajas: ausencia de riesgo de contaminación con patógenos animales, bajo costo (especialmente para la producción a gran escala), alto rendimiento de la proteína foránea, anticuerpos ensamblados apropiadamente o con un plegamiento protei-

co equivalente al encontrado en otros sistemas eucarióticos, posibilidad de expresar anticuerpos humanizados, expresión de vacunas múltiples en un mismo órgano vegetal comestible, facilidad de manejo de plantas en invernadero, rápida distribución de plantas a escala mundial y posibilidad de producir vacunas comestibles para la vacunación masiva (Noguera & Fermín 2013).

Por otra parte, el uso conjunto de esta estrategia de expresión de proteínas heterólogas con otras herramientas de la biología molecular como la mutagénesis sitio-dirigida o sitio-específica, por sus siglas en inglés SSM y SDM respectivamente; ha resultado de mucho valor en el diseño y construcción de estos vectores químicos; ya que permite realizar manipulaciones o alteraciones más controladas de los genes de interés. En este sentido, la SDM dirigida por oligonucleótidos (cebadores) sintéticos, en la cual se alteran los genes en el ADN clonado a través de amplificaciones por PCR, resulta ser un método muy poderoso que permite realizar sustituciones, inserciones o deleciones de una o más bases en una secuencia específica de nucleótidos (Carter 1986; Ho *et al.* 1989; Vallette *et al.* 1989; Nassal & Rieger 1990; Hall & Emery 1991; Yao *et al.* 1992; Weiner *et al.* 1993, 1994; Silvestrov *et al.* 2014; Xia *et al.* 2015; Frandoloso *et al.* 2015). La estrategia es sorprendentemente efectiva, pero laboriosa; dado que requiere dos cebadores mutagénicos, dos cebadores silvestres (nativos) que flanquean la secuencia de interés, tres rondas de amplificación por PCR por cada mutación que se desea introducir (Ho *et al.* 1989; Sambrook & Russell 2001) y de dos a tres pasos de purificación de los productos de la

amplificación. Además, la verificación de la estrategia involucra secuenciación precisa de la región de interés a fin de comprobar que sólo se ha producido el cambio que se desea.

En el presente estudio se reporta la construcción de una quimera viral infectiva basada en genes de los virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV), del mosaico verde suave del tabaco (*Tobacco mosaic green mosaic virus*, TMGMV) y del HIV-1, y su posterior validación a través de ensayos de digestión, secuenciación y pruebas de RT-PCR. Además se demuestra el uso del método de la extensión solapada para crear una mutagénesis sitio-dirigida, en la que se alteraron las secuencias de nucleótidos reconocidas por las endonucleasas de restricción (ERs) *XhoI* y *KpnI* ubicadas en el gen *nef*. La razón por la cual se

planteó esta estrategia se debe al hecho de que los sitios de restricción que se desean alterar dentro del gen *nef* también se encuentran dentro de la secuencia del vector de expresión viral pTMV30B-GFPC3 (p30B) en el cual se propuso clonar el gen señalado (FIGURAS 1 y 2). La secuencia de reconocimiento de *XhoI* se ubica específicamente en el sitio de clonación múltiple de este vector viral, mientras que la secuencia reconocida por la ER *KpnI* se localiza en el extremo 3' del casete de expresión. Esta última enzima es la que se emplea en este sistema de expresión heteróloga para linearizar el plásmido recombinante p30B previo a la reacción de transcripción *in vitro*, cuyo propósito es producir clones de ARN infectivos del virus del mosaico del tabaco para su inoculación en plantas (Shivprasad *et al.* 1999).

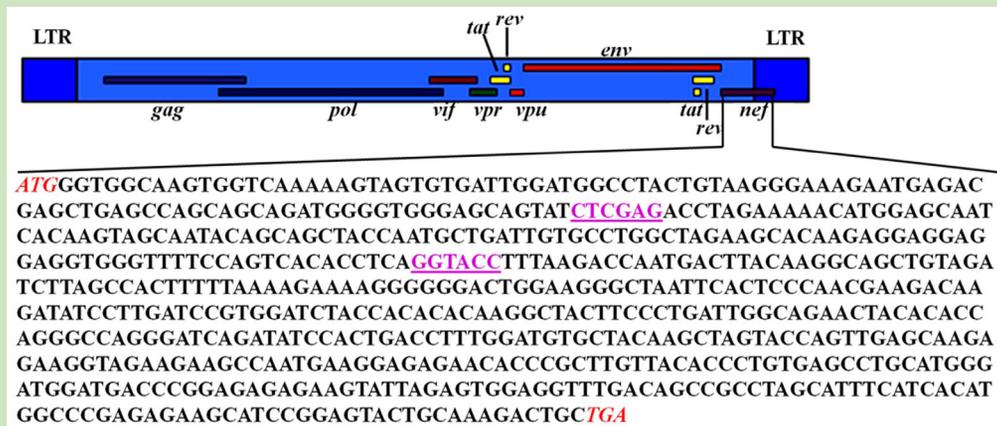


FIGURA 1. Estructura del genoma del VIH-1 mostrando los genes que codifican para las proteínas estructurales internas (*gag*), estructurales externas (*env*), enzimáticas (*pol*), auxiliares regulatorias (*tat* y *rev*) y auxiliares accesorias (*vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*), adaptado de Flint *et al.* (2004). En la secuencia del gen *nef* detallada se encuentran señalados en cursiva los codones de inicio (ATG) y terminación (TGA) de la transcripción, así como las secuencias de nucleótidos reconocidas por las ERs *XhoI* (CTCGAG) y *KpnI* (GGTACC) que se representan subrayadas.

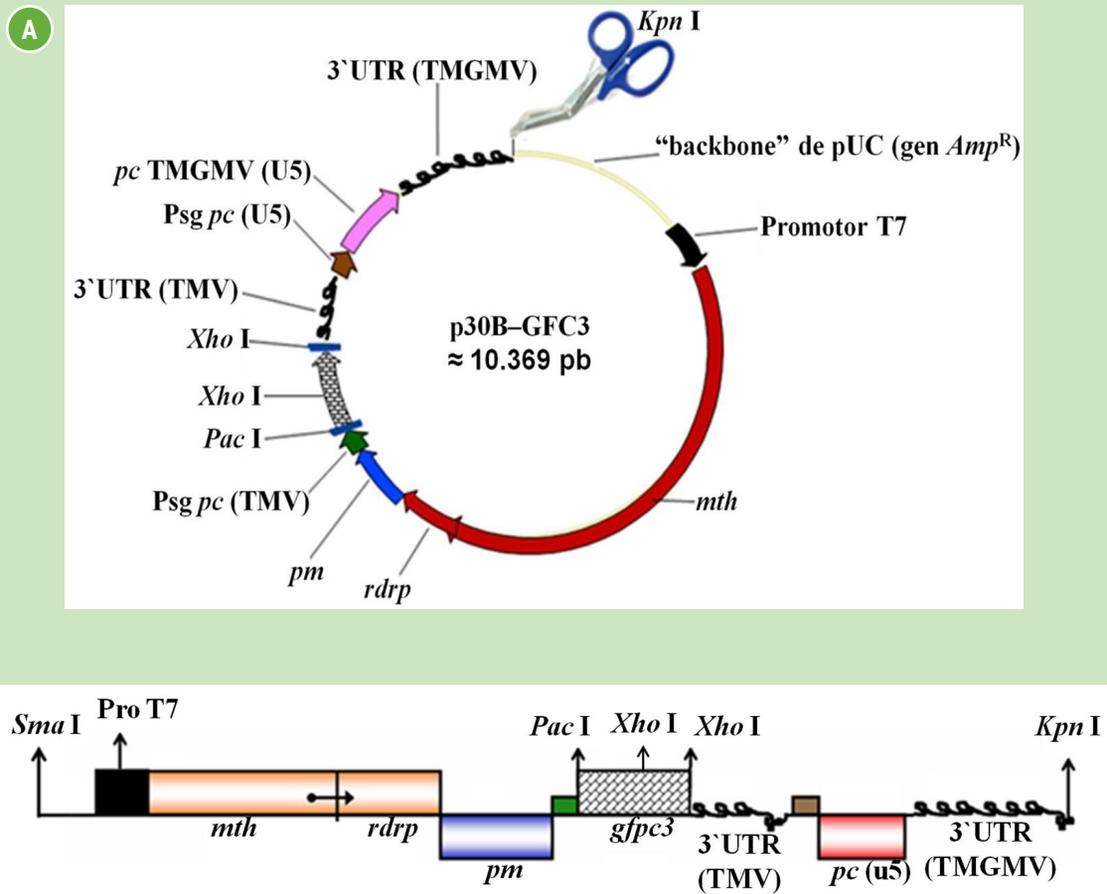


FIGURA 2. Estructura del vector de clonación/expresión viral p30B-GFPC3 antes [A] y después [B] de ser linearizado con la ER *KpnI*, adaptado de Shivprasad *et al.* (1999), Fauquet *et al.* (2005) y Meyers *et al.* (2008). Los tres primeros genes pertenecen al virus del mosaico del tabaco (TMV). El primero de ellos codifica para una proteína con dos dominios funcionales: uno metiltransferasa que actúa añadiendo un residuo de metilguanosa (M_7G) al extremo 5' del ARN recién sintetizado (encabezamiento), y un dominio C-terminal que tiene similitud con ARN helicasas. El segundo marco de lectura codifica para la replicasa viral (R) o ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), y el tercero para la proteína de movimiento (PM). La caja de rectángulos simboliza el marco de lectura de la proteína fluorescente verde (GFP por sus siglas en inglés), cuya expresión está bajo el control del promotor nativo del gen codificante de la proteína de la cápside (*pc*) del TMV. El quinto marco de lectura codifica para la proteína de cápside del virus del mosaico verde suave del tabaco (*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV). Se muestran las regiones 3' no traducidas (3'UTR) del TMV (3 pseudonudos) y del TMGMV (6 pseudonudos). Las cajas verde y marrón representan los promotores sub-genómicos nativos de la PC del TMV y del TMGMV, respectivamente. Con flechas se indican los sitios de reconocimiento para las ERs *PacI* y *XhoI* utilizados para la inserción del gen de interés y el sitio *KpnI* empleado para linearizar el plásmido previo a la reacción de transcripción *in vitro*.

OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR MODIFICADOS

Los productos de la amplificación por PCR portadores de las mutaciones puntuales se obtuvieron utilizando la ADN polimerasa Go-Taq®Green (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Por cada sustitución puntual se utilizaron dos cebadores mutagénicos (FM y RM), dos cebadores silvestres que flanquean el gen de interés (FS y RS) y tres rondas separadas de amplificación por PCR. La amplificación de los fragmentos de ADN solapantes se llevó a cabo en un volumen final

de 25 µl, compuesto por 12,5 µl de la mezcla maestra (MM) de ADN polimerasa, 2.5 mM de MgCl₂ y buffer de reacción 1X (Promega) más 8 pmoles/µl de cada uno de los cebadores y 6 ng/µl de ADN plasmídico del vector pETNef. Las combinaciones de los juegos de cebadores, el tamaño esperado de los productos de la amplificación y los perfiles térmicos de la PCR para cada uno de los fragmentos del gen *nef*, se especifican en los **CUADROS 2 y 3**.

La tercera ronda de amplificación por PCR, cuyo propósito era reamplificar el gen *nef* completo llevando las secuencias mutadas a través

CUADRO 2. Combinaciones de cebadores utilizados para amplificar el gen *nef* y tamaños esperados de los amplicones totales y parciales para este gen en pares de bases (pb).

CEBADOR		TAMAÑO ESPERADO DEL AMPLICÓN (pb)
FORWARD	REVERSE	
FS-Nef	RS-Nef	697
FS-Nef	RM- <i>Xho</i> I	133
FM- <i>Xho</i> I	RS-Nef	564
FS-Nef	RM- <i>Kpn</i> I	250
FM- <i>Kpn</i> I	RS-Nef	447

CUADRO 3. Perfiles térmicos empleados para la amplificación total o parcial del gen *nef* por PCR.

COMBINACIONES DE CEBADORES	ETAPA DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR					
	DESATURALIZACIÓN		ANILLAMIENTO		EXTENSIÓN	
FS/RM- <i>Xho</i> I	94°C	1'	55°C	1'	72°C	1'
FM- <i>Xho</i> I/RS	94°C	1'	63°C	1'	72°C	1'
FS/RM- <i>Kpn</i> I	94°C	1'	55°C	1'	72°C	1'
FM- <i>Kpn</i> I/RS	94°C	1'	63°C	1'	72°C	1'
FS/RS	94°C	1'	55°C	1'	72°C	1'

Todas las reacciones fueron expuestas a una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 5' y una extensión final de 72 °C durante 5'.

de una reacción de extensión solapada, se realizó en un volumen de 100 μ l, consistiendo de 50 μ l de MM, 0,1 nM de los cebadores FS y RS y 4 μ l de cada uno de los amplificadores parciales obtenidos en las dos primeras rondas de amplificación por PCR. El esquema de la estrategia metodológica de las amplificaciones por PCR realizadas se representa en la **FIGURA 3**.

PURIFICACIÓN DE LOS AMPLICONES Y DEL ADN PLASMÍDICO

La purificación de los amplicones parciales obtenidos en las dos primeras rondas de amplificación por PCR se realizó fraccionando el ADN por electroforesis en geles de agarosa en buffer Tris-acetato (100 mM de Tris-HCl más 10 mM de EDTA pH 8,0), conteniendo 0,1 μ g/ml de

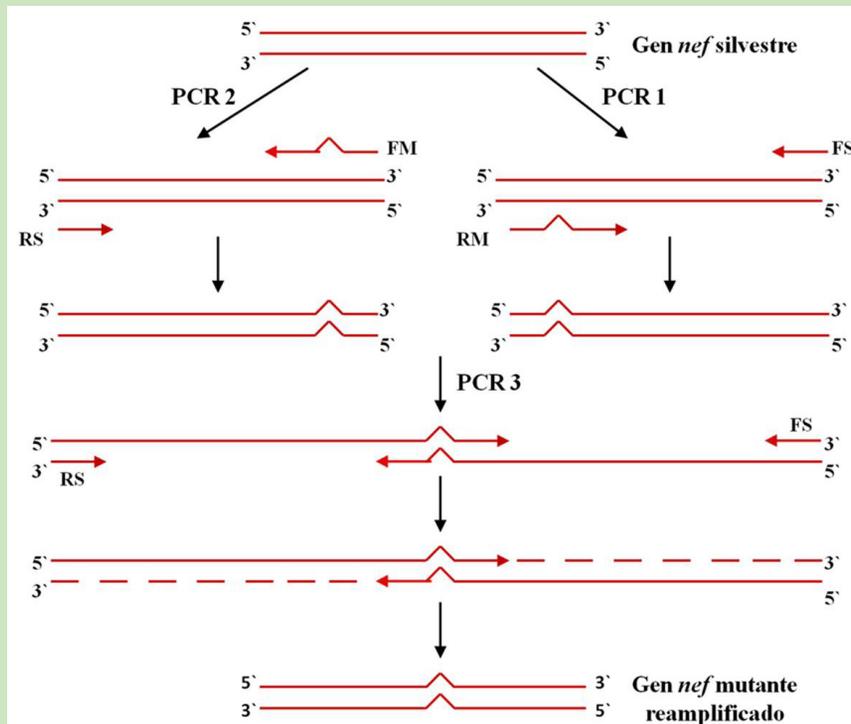


FIGURA 3. Diagrama esquemático de la mutagénesis sitio-específica por extensión solapada utilizando la amplificación por PCR, modificado de (Sambrook & Russell 2001). En las dos primeras rondas de amplificación por PCR se generan dos fragmentos separados del gen blanco (en nuestro caso, *nef*). El amplicón de la PCR 1 está delimitado por secuencias complementarias al cebador forward silvestre (FS) y uno reverse mutante (RM), mientras que el amplicón de la PCR 2 se encuentra delimitado por secuencias complementarias a un cebador forward mutante (FM) y uno reverse silvestre (RS). En la amplificación por PCR 3 se utilizan ambos cebadores silvestres para reamplificar la secuencia portadora de la mutación puntual. Las mutaciones puntuales se simbolizan como una línea quebrada en los cebadores FM y RM.

bromuro de etidio; la corrida electroforética se efectuó a 5 vol/cm. Las bandas de tamaño esperado se cortaron del gel y se purificaron utilizando el kit FavorPrep™ (Favorgen®) con algunas modificaciones. Los productos de la tercera amplificación (reamplificación) se purificaron mediante una extracción orgánica con cloroformo, precipitación con acetato de amonio 10 M más dos volúmenes de etanol absoluto y posteriores lavados con etanol 70%. El ADN plasmídico de los vectores de clonación pETNef y p30B se purificaron de la misma forma que se procedió con los productos de la reamplificación del gen *nef*.

ENSAYOS DE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

Con el propósito de validar la introducción exitosa de las mutaciones puntuales, los productos del gen *nef* reamplificado se expusieron a digestiones separadas con las ERs *KpnI* y *XhoI* (Promega). Las reacciones se realizaron en un volumen de 20 µl, compuestas de 2 µl de buffer de digestión 10X, 0,2 µl de albúmina sérica bovina acetilada (BSA) (10 µg/ml), 0,3 U (unidades) de enzima y 1 µg/µl de los productos de la amplificación por PCR. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora ó 16 horas. Estas mismas condiciones experimentales fueron utilizadas en digestiones previas del gen *nef* sin modificar.

DIGESTIÓN SIMULTÁNEA DEL INSERTO Y DEL VECTOR

Previo a la reacción de ligación del ADN plasmídico del vector p30B con el inserto *nef* modificado, ambas moléculas se expusieron a una digestión simultánea con las ERs *PacI* y *XhoI*. El sistema de digestión consistió de 2 µl de buffer

4 (New England Biolabs), 0,2 µl de BSA y 0,3 U de cada una de las ERs. La mezcla de reacción se completó a 20 µl con agua estéril libre de nucleasas y se incubó a 37°C durante 16 horas.

LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN

La reacción de ligación se realizó empleando el método “Coffee Break Ligation” propuesto por Yoshino *et al.* (2007), para lo cual se ajustaron las concentraciones de ADN molde del inserto y del vector a 2 y 6 ng/µl, respectivamente. El buffer de ligación estaba compuesto por 66 mM de Tris/HCl pH 7,6, 6,6 mM de MgCl₂, 5 µl de β-ME/ml, 0,5 mM de ATP, 14% de PEG 6000, 25 ng/µl de ASB y 0,02 U/µl de ligasa, la cual se diluyó previamente en el mismo buffer de ligación. La mezcla de reacción se completó a 20 µl con agua destilada estéril y se incubó a 20°C durante 10 min. Seguidamente se procedió a transformar células competentes de *E. coli*, cepa XL1-Blue preparadas por el método del TSS propuesto por Chung *et al.* (1989). La selección de los clones transformantes se realizó en medio LB agarizado suplementado con 12,5 µg/ml de tetraciclina más 100 µg/ml de ampicilina.

SECUENCIACIÓN DE LOS AMPLICONES MUTADOS

Con el propósito de confirmar los resultados observados en los ensayos de digestión, los productos de la amplificación por PCR del gen *nef* reamplificado y clonado en el vector p30B se purificaron utilizando el kit AxyPrep Plasmid™ (Axygen®) con algunas modificaciones. El análisis del producto purificado se realizó por electroforesis en geles de agarosa con las mismas condiciones señaladas en el punto de

purificación de los productos de la PCR. Las muestras así procesadas se resuspendieron en una concentración de 100 ng/μl para su secuenciación mediante el método de Sanger (Eurofins, MWG-Operon, Huntsville, Alabama).

TRANSCRIPCIÓN “IN VITRO”

Los transcritos de ARN portando un análogo de metilguanosa (5´7MeGpppG5´) en el extremo 5´-UTR, se sintetizaron utilizando el sistema de producción de ARN a gran escala RiboMAX™ (Promega, Madison, WI) con algunas modificaciones. Con este propósito el ADN del vector p30B portando el gen *nef* modificado (p30BNefM), linearizado previamente con la ER *KpnI*, se sometió a una reacción de filling-in (Promega, Madison, WI; Sambrook y Russell, 2001) utilizando 2,5 U/μl de ADN polimerasa del bacteriófago T4 en presencia de 2 mM de dGTP durante 10 min a 37°C, seguido por inactivación a 70°C durante 5 min. La reacción final estaba compuesta por una mezcla de buffer de transcripción 5X, 100 mM de DTT, 25 mM de cada rATP, rCTP, rUTP, 3 mM rGTP, 5 mM de m⁷G, 40 u/μl de RNasin, 1 mg/ml de albúmina sérica bovina desacetilada y 20 u/μl de ARN polimerasa del fago T7. La reacción se incubó a 37°C durante 2 horas.

INOCULACIÓN DE PLANTAS CON TRANSCRIPTOS “IN VITRO”

El ARN viral quimérico se diluyó en un volumen de buffer fosfato de sodio 30 mM, pH 8,0 en agua-DEPC libre de RNasas. La mezcla se utilizó para inocular mecánicamente plantas de *Nicotiana benthamiana* en estado vegetativo (4 hojas típicas), las cuales habían sido pre-

viamente tratadas con un período de oscuridad durante 24 horas. Previo a la inoculación de los transcritos virales la superficie de las hojas se cubrieron con Carburundum 600 mesh. Como control negativo se utilizarán plantas de la misma especie rociadas sólo con abrasivo y buffer de inoculación. Una vez culminado el proceso de inoculación las hojas se lavaron con agua-DEPC. Las plantas se mantuvieron en invernadero con fotoperíodo natural y termoperíodo de 25±10°C. El material tratado se observó diariamente hasta la aparición de síntomas.

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL A PARTIR DE PLANTAS INOCULADAS CON TRANSCRIPTOS “IN VITRO”

El aislamiento del ARN total a partir de plantas inoculadas con el ARN viral quimérico producido “*in vitro*”, se realizó utilizando el reactivo TRIzol™ (Invitrogen). La concentración y la pureza se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}) en un espectrofotómetro modelo Biowave DNA (Biochrom Ltd, UK); mientras que la integridad y el tamaño del ARN total se determinó a través de electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

RT-PCR A PARTIR DE ARN TOTAL

El ARN total aislado y purificado se utilizó para establecer la síntesis de la primera banda de ADN a través del sistema ImProm-II™ (Promega, Madison, WI.). La producción de la hebra de ADN complementario se realizó a partir de una muestra de 1 μg de ARN, el cual se desnaturalizó previamente durante un paso de incubación inicial a 70°C durante 5 minutos junto con 20

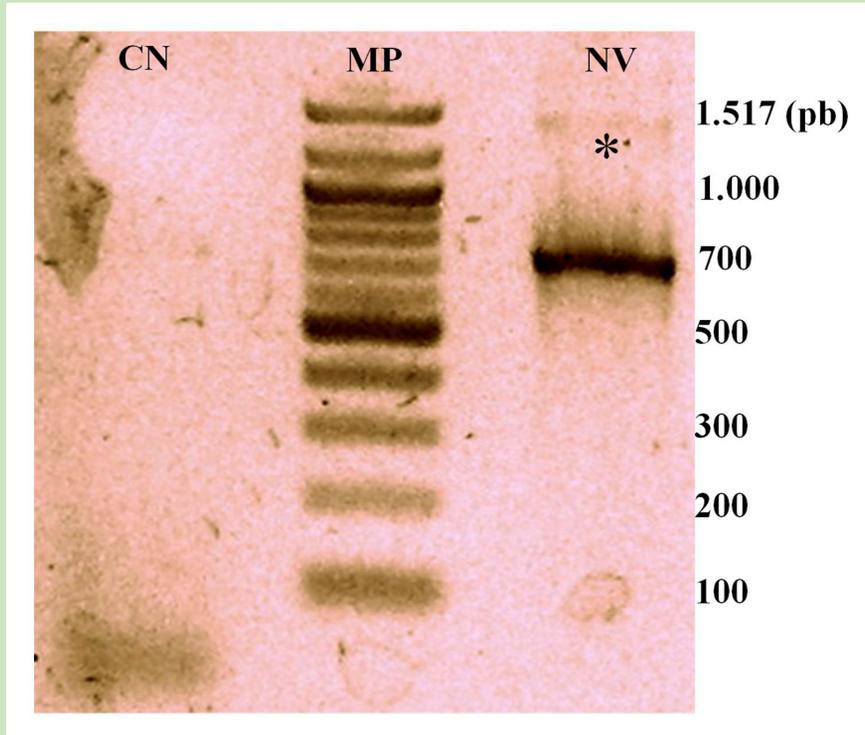


FIGURA 4. Producto de la amplificación por PCR del gen *nef* a partir del vector de clonación pETNef. **NV:** gen *nef* del VIH-1, **CN:** control negativo, **MP:** Marcador de peso molecular, 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs), *amplificado inespecífico.

visualizar la forma linearizada del plásmido, mientras que su digestión con *XhoI* determinó la aparición de un fragmento de aproximadamente 300 pb (**FIGURA 6A**) y de dos fragmentos de 300 y 400 pb aproximadamente cuando el vector era digerido utilizando las ERs *PacI* y *XhoI* simultáneamente (**FIGURA 6B**).

Los amplicones parciales del gen *nef* portadores de las mutaciones para los sitios *XhoI* y *KpnI* se desarrollaron a través de amplificaciones por PCR a partir de las combinaciones de cebadores FS/RM para los fragmentos pequeños y FM/RS para los fragmentos grandes

(**CUADRO 2**). Los productos de la amplificación por PCR con la mutación *XhoI* se obtuvieron a partir de la secuencia del gen *nef* silvestre clonado en el vector pETNef. Los fragmentos presentaron tamaños aproximados de 133 pb el pequeño y 563 pb el grande (**FIGURA 7**). Por consiguiente, los amplificados con la mutación *KpnI* se desarrollaron a partir del gen *nef*-mutante *XhoI*, una vez que se validó la mutación a través de ensayos de digestión con la ER *XhoI* (datos no mostrados). Los fragmentos mutados para el sitio *KpnI* mostraron tamaños de 250 pb el pequeño y 446 pb el grande aproxima-

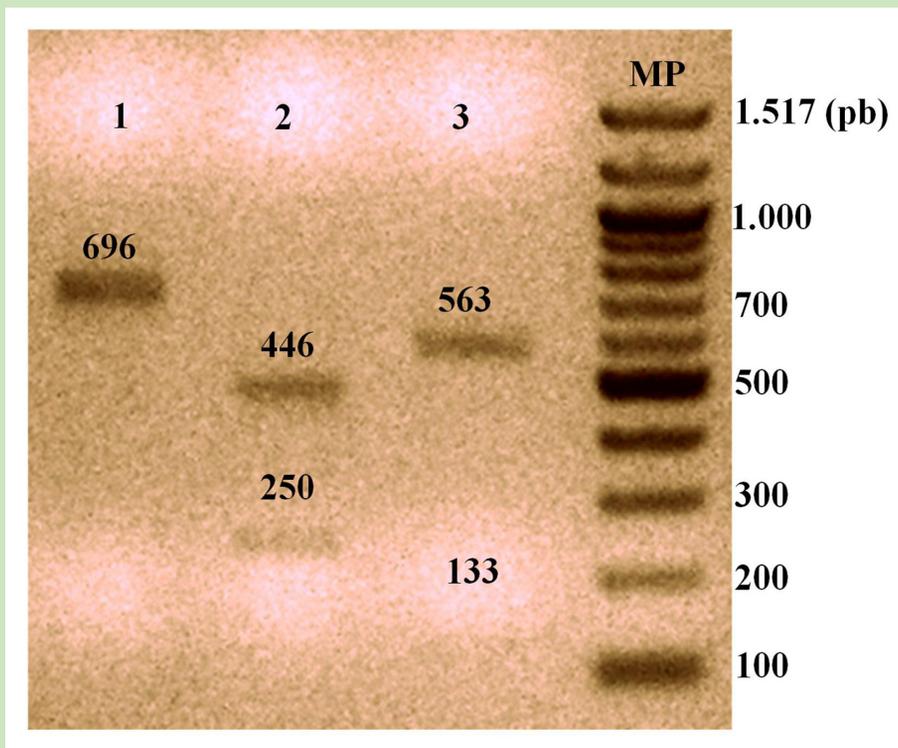


FIGURA 5. Productos de la digestión del gen *nef* tratado con las ERs *KpnI* y *XhoI*. 1: amplicón *nef* sin digerir, 2: amplicón *nef* digerido con la ER *KpnI*, 3: amplicón *nef* digerido con la ER *XhoI*, MP: Marcador de peso molecular, 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs).

damente (FIGURA 8). Estos resultados se corresponden con los datos obtenidos en los ensayos de digestión del gen *nef* silvestre realizados previamente (FIGURA 5).

La reamplificación del gen mutante llevando las sustituciones puntuales, se realizó a partir de estos últimos dos fragmentos en combinación con los primers FS y RS (FIGURA 3). Los productos de la extensión solapada presentaron tamaños de 700 pb aproximadamente, lo que concuerda con el tamaño del gen silvestre amplificado a partir del vector pETNef. Los amplicones doble mutantes sometidos a digestión

durante 16 h con las ERs *XhoI* y *KpnI* permitieron observar bandas intactas; es decir, del mismo tamaño del gen *nef* silvestre sin digerir (FIGURA 9). No obstante, la digestión del gen silvestre ocurrió de manera parcial o total cuando fue expuesto a estas ERs durante 1 hora ó 16 horas, respectivamente.

Los amplicones mutantes de tamaño esperado que se ligaron al vector de expresión viral p30B por los sitios *PacI-XhoI*, fueron secuenciados para confirmar los resultados observados en los ensayos de digestión. Los datos de los electroferogramas y de los alineamientos de

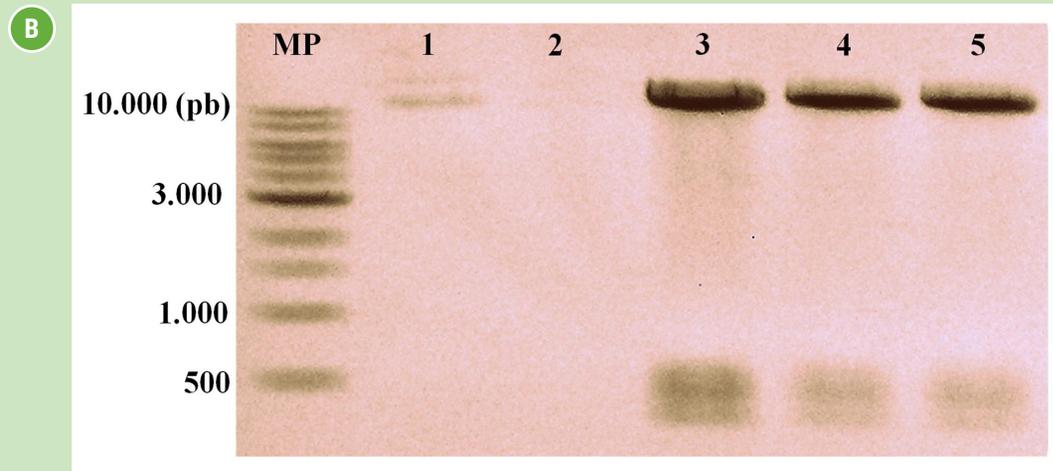
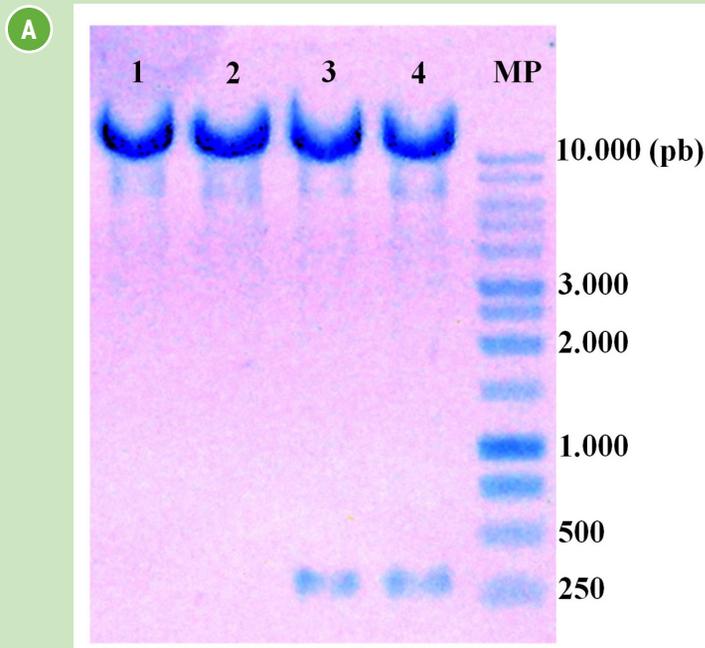


FIGURA 6. Productos de la digestión del vector p30B tratado con las ERs *PacI*, *KpnI* y *XhoI*. **[A]:** 1 vector digerido con la ER *KpnI*, 2 vector digerido con la ER *PacI*, 3 vector digerido con la ER *XhoI* (Promega), 4 vector digerido con la ER *XhoI* (New England Biolabs), **MP** marcador de peso molecular, 1 kb DNA Ladder (Promega). **[B]:** 1 vector sin digerir, 2 pozo vacío, 3, 4 y 5 vector aislado a partir de tres clones diferentes y digeridos simultáneamente con las ERs *PacI* y *XhoI*, **MP** marcador de peso molecular, 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

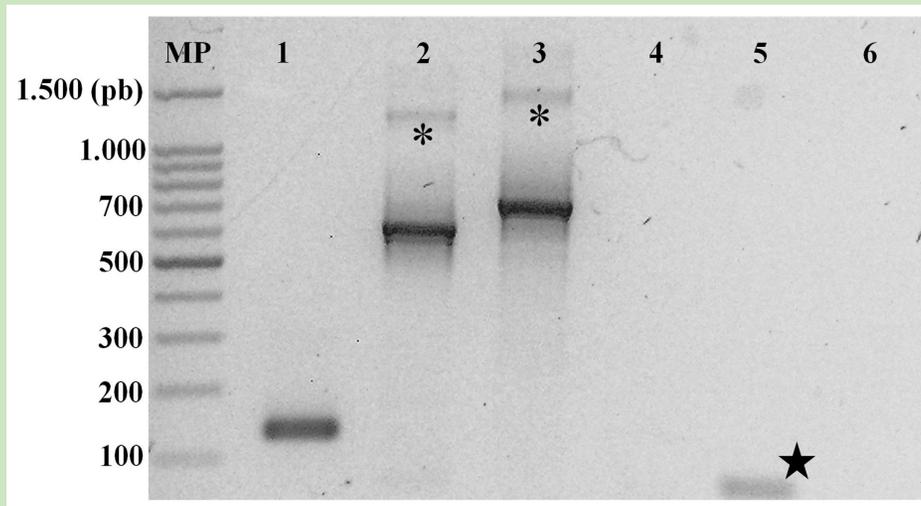


FIGURA 7. Productos de la PCR mostrando los amplificados parciales y completo del gen *nef* obtenidos a partir del vector de clonación pETnef. **1, 2:** fragmentos pequeño y grande del gen *nef*, respectivamente, portando el sitio de restricción mutante para la ER *Xho*I, **3:** gen *nef* completo (control positivo), **4, 5, 6:** controles negativos de la reacciones 1, 2 y 3, respectivamente, **MP:** Marcador de peso molecular de 100 bp DNA Ladder (Promega), *amplificado inespecífico, con una estrella se simboliza un dímero de cebadores observado en la reacción 5.

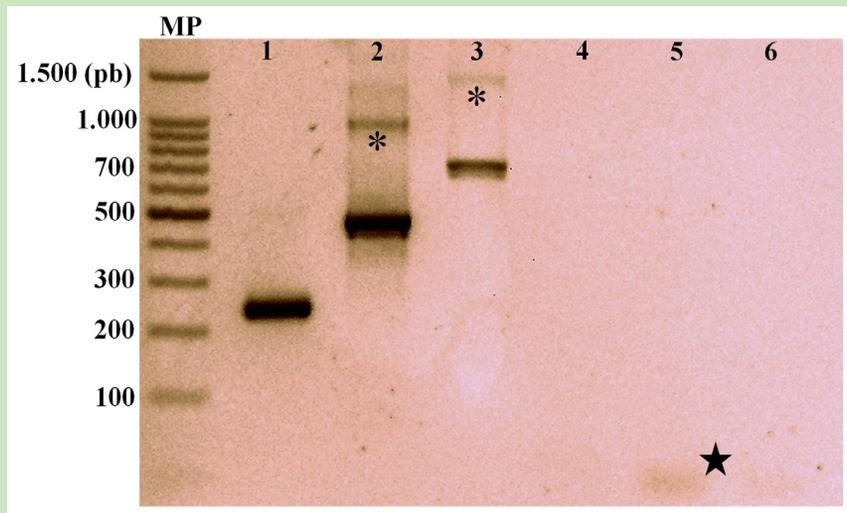


FIGURA 8. Productos de la PCR mostrando los amplificados parciales y completo del gen *nef* obtenidos a partir del gen *nef* mutante para el sitio *Xho*I. **1, 2:** fragmentos pequeño y grande del gen *nef*, respectivamente, portando el sitio de restricción mutante para la ER *Kpn*I, **3:** gen *nef* completo (control positivo), **4, 5, 6:** controles negativos de la reacciones 1, 2 y 3, respectivamente, **MP:** Marcador de peso molecular de 100 bp DNA Ladder (Promega), *amplificado inespecífico, con una estrella se simboliza un dímero de cebadores observado en la reacción 5.

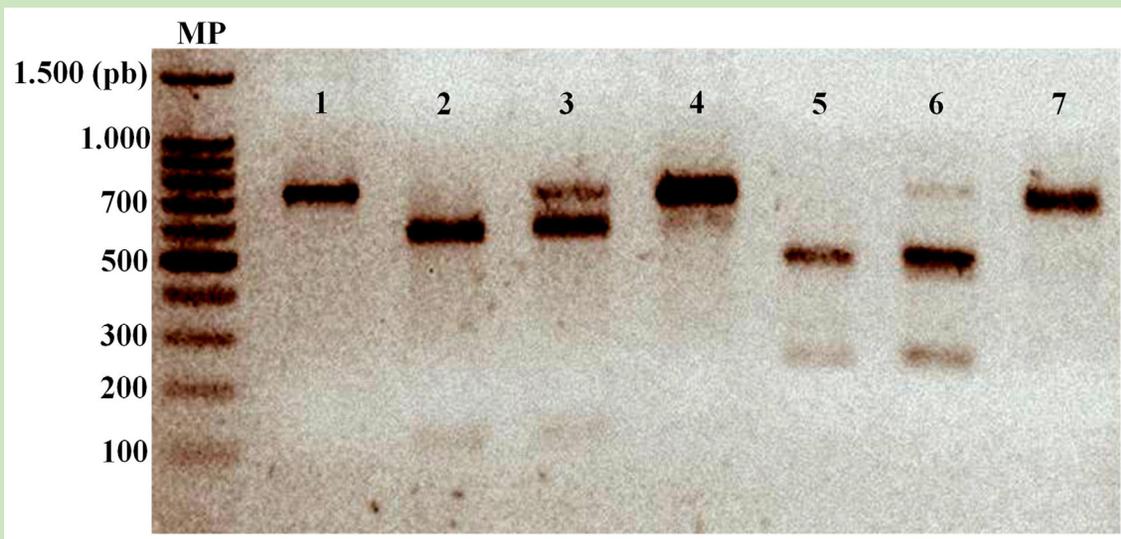


FIGURA 9. Productos de las digestiones del amplicón del gen *nef* tratado con las ERs *KpnI* y *XhoI*. **1** gen *nef* silvestre sin digerir, **2** gen *nef* silvestre digerido con la ER *XhoI* luego de 16 h, **3** gen *nef* silvestre digerido con la ER *XhoI* luego de 1 h, **4** gen *nef* doble mutante digerido con la ER *XhoI* luego de 16 horas, **5** gen *nef* silvestre digerido con la ER *KpnI* luego de 16 h, **6** gen *nef* silvestre digerido con la ER *KpnI* luego de 1 h, **7** gen *nef* doble mutante digerido con la ER *KpnI* luego de 16 horas, **MP** Marcador de peso, 100 bp DNA Ladder (Promega).

las secuencias obtenidas en este estudio con la secuencia control del gen silvestre clonado en el vector pETNef y secuencias de aislados virales obtenidas en el Banco de Genes (números de accesiones U44455.1, EU432535.1, FJ659461.1, AY167123.1, KJ925006.1), permitieron confirmar las sustituciones puntuales introducidas (**FIGURAS 10 y 11**). Estos resultados dejan en evidencia la utilidad que, a pesar de lo laborioso, tiene el método de extensión solapada por PCR para solventar este tipo de situaciones, en la cual los procesos de ligación y linearización del plásmido recombinante estaban afectados por la presencia de los sitios de restricción de las ERs *XhoI* y *KpnI*.

Los ensayos de inoculación mecánica con el ARN viral quimérico producido a partir de la reacción de transcripción “*in vitro*” permitió infectar eficientemente plantas de *N. benthamiana* luego de un período de 28 días post-inoculación; Sin embargo, no fue sino hasta alcanzados los 60 días de incubación cuando las plantas tratadas lograron desarrollar síntomas más evidentes y característicos de infecciones virales, tal como se reflejan en la **FIGURA 12**.

La extracción de ARN total a partir de las plantas inoculadas con los transcritos virales permitió obtener ARN total de alta calidad; es decir, no degradado y de tamaño esperado (**FIGURA 13**). Los datos de concentración de ARN obtenidos oscilaron entre 2.360 µg/ml y 340 µg/ml;

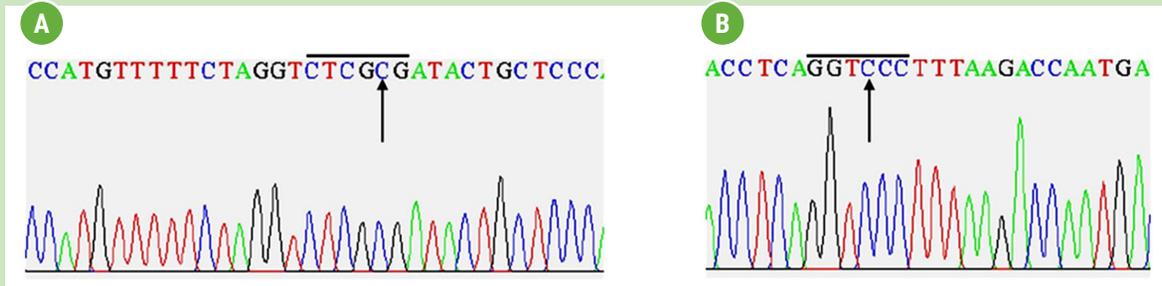


FIGURA 10. Electroferogramas mostrando las mutaciones puntuales que alteraron los sitios de restricción reconocidos por las ERs *Xho*I [A] y *Kpn*I [B]. En [A] se muestra parte de la secuencia reversa complementaria y en [B] de la secuencia directa.



FIGURA 11. Alineamiento de las secuencias amplificadas de genes *nef* silvestre (Nef-IDIC), *nef* mutante (presente en el Vector de Virus de Planta, Nef-VVP) y de secuencias de aislados virales depositadas en el Banco de Genes. Se señalan con flechas los sitios mutagenizados reconocidos por las endonucleasas *Xho*I [A] y *Kpn*I [B].

mientras que las relaciones entre las lecturas a 260 nm y 280 nm ($A_{260}:A_{280}$) reflejaron medidas que se encontraron entre 1,357 y 2,429.

Las pruebas de RT-PCR utilizando el ARN total extraído a partir de plantas inoculadas con los transcritos “*in vitro*”, permitieron confirmar la presencia de los genes *nef*, *pc* y *rdrp* en un número representativo de plantas evaluadas. Aun cuando el rendimiento del producto de la amplificación varió entre los genes estudiados para aquellas muestras que

se analizaron a través de ensayos de RT-PCR, los resultados se mantuvieron consistentes en dos ensayos realizados independientemente (FIGURA 14). Estos análisis permitieron obtener productos de la amplificación por PCR conforme a los tamaños esperados para cada uno de los genes evaluados. En el caso de los amplicones para *nef* y *pc* los productos obtenidos se encuentran alrededor de los 700 pb, mientras que el producto de la amplificación para el gen *rdrp* alcanzó los 450 pb aproximadamente; este

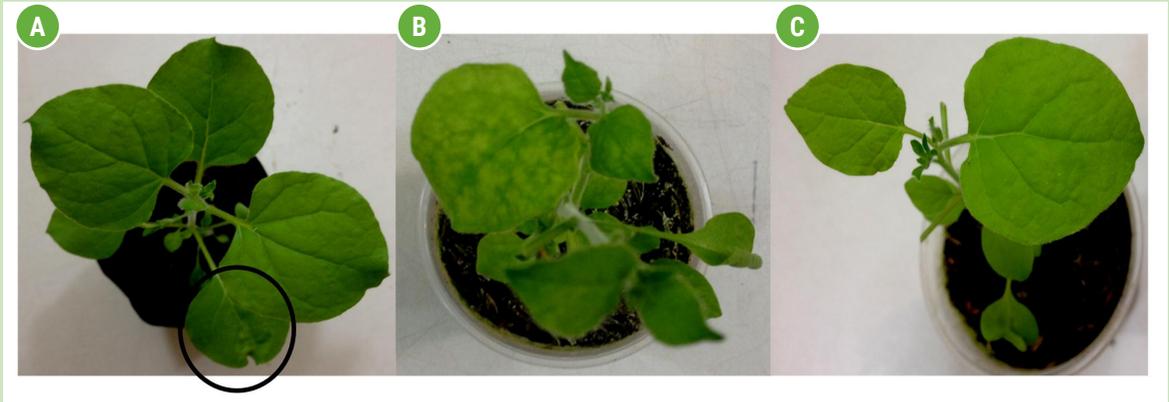


FIGURA 12. Plantas de *N. benthamina* inoculadas con transcritos "in vitro" del vector p30B modificado, luego de un período de incubación de 60 días post-inoculación. Nótese el desarrollo de una ligera distorsión de la lámina foliar, ampollas [A] y moteado [B], planta sana [C].

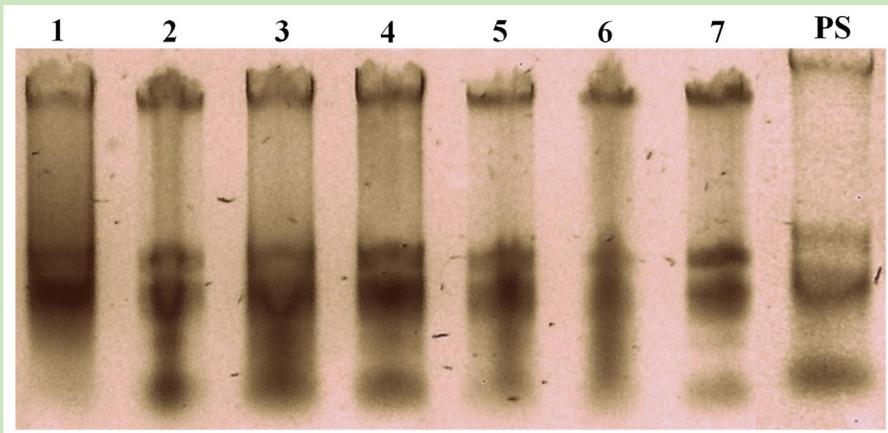


FIGURA 13. Productos de la extracción de ARN total a partir de plantas inoculadas con transcritos virales del vector p30B modificado obtenidos "in vitro". **Pozos 1-7:** plantas inoculadas, **PS:** planta sana (control negativo).

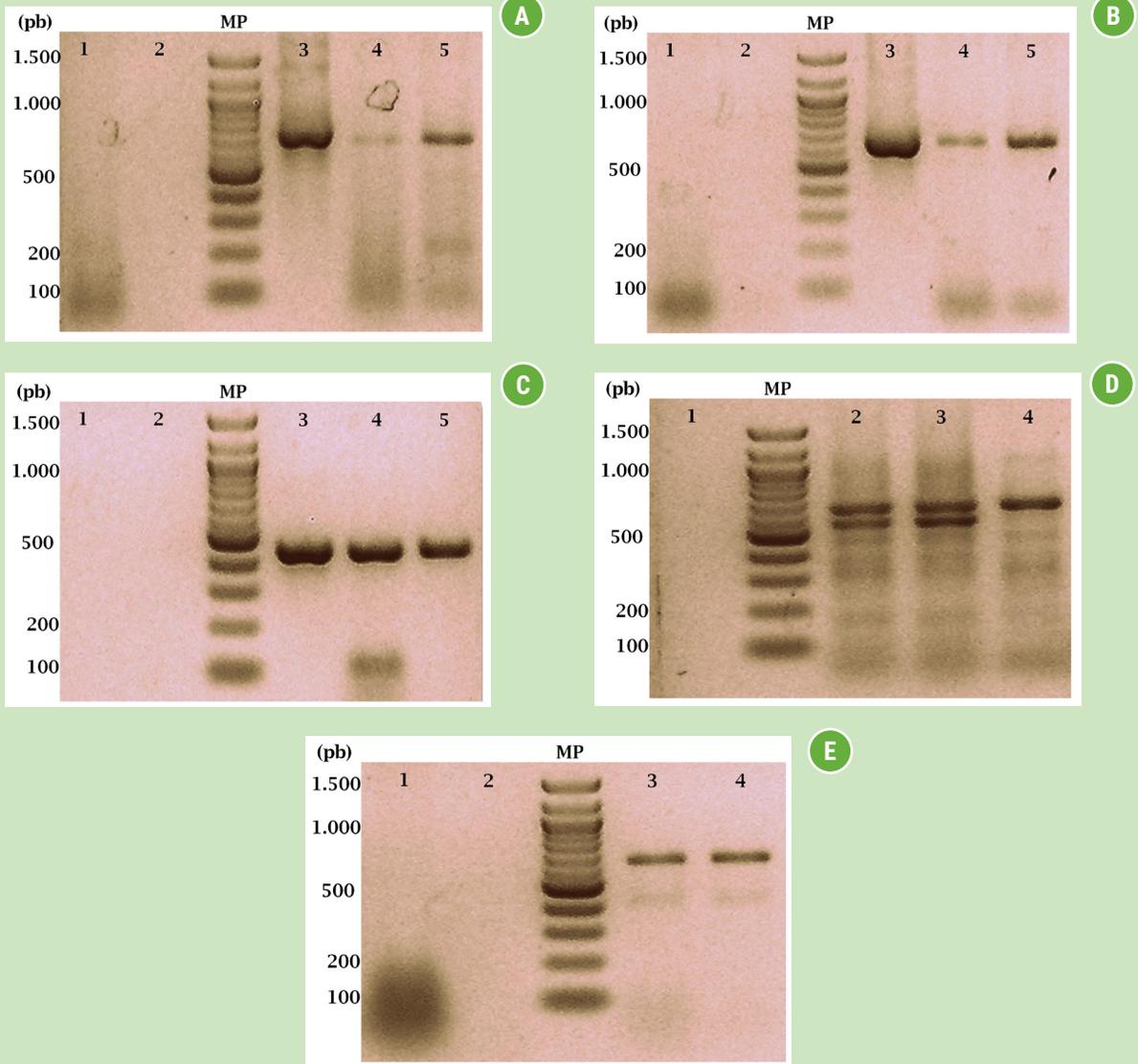


FIGURA 14. Productos de la amplificación por RT-PCR de los genes *nef*, *pc* y *rdrp* a partir de ARN total extraído de plantas inoculadas con transcritos “*in vitro*”. Se muestran los amplicones con tamaños esperados para los genes *nef* del VIH-1 [A], *pc* del TMGMV [B] y *rdrp* del TMV [C]. El gen de la β -actina se utilizó como control de la integridad y amplificabilidad del ARN [D], y como control de la RT-PCR se empleó el gen de la proteína de cápside del virus de la mancha anillada de la lechosa *pc*-PRSV [E]. En A, B y C 1: RT-PCR a partir de planta sana, 2: control negativo de PCR, 3: control positivo de PCR, 4, 5: RT-PCR de plantas inoculadas y evaluadas para los genes respectivos, MP: Marcador de peso molecular, 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs). En D 1: control negativo de PCR, 2: RT-PCR a partir de planta sana, 3, 4: RT-PCR de plantas inoculadas. En E 1: RT-PCR a partir de ARN total de planta sana, 2: control negativo de PCR, 3: control positivo de PCR a partir de ADN plasmídico donde se encuentra clonado el gen *pc*-PRSV, 4: RT-PCR a partir de planta inoculada.

último producto se corresponde con el tamaño esperado para el extremo 5´ terminal de la replicasa viral del TMV.

DISCUSIÓN

El tamaño del amplificado del gen *nef* obtenido por PCR concuerda con el reportado por Michael *et al.*, (1995); van Marle *et al.*, (2004) y Parreira *et al.*, (2005); pero presenta una gran variación con el tamaño de los fragmentos obtenidos por Ratner *et al.*, (1996) y Rangel *et al.*, (2009), quienes consiguieron amplificadores de 900 y 919 pb, respectivamente. Esta diferencia pudiera estar relacionada con el tamaño de la secuencia codificante del gen *nef*, el cual determina la síntesis de una proteína cuyo tamaño oscila entre los 25 y 35 kDa (Geyer y Peterlin, 2001; Marusic *et al.*, 2007); o más probablemente, puede estar asociada con la amplificación conjunta del gen *nef* y de un fragmento de la región regulatoria 3´ del genoma del VIH (Ratner *et al.*, 1996; Rangel *et al.*, 2009).

Los resultados alcanzados en la presente investigación permitieron evidenciar la introducción de mutaciones sitio-dirigidas en el interior de un gen que tiene un papel importante en la regulación, replicación, patogenia y progresión de las enfermedades desencadenadas por el VIH-1 (Shugars *et al.* 1993; Cammack 1995; Geyer & Peterlin 2001; Marusic *et al.* 2009; Salmen *et al.* 2010). Específicamente, las sustituciones se introdujeron en el nucleótido 103 para el sitio de restricción de la enzima *XhoI* y 223 para el sitio de la enzima *KpnI*. Bajo el concepto del sistema de clonación/expresión detallado en el presente estudio, los resultados de las digestiones del amplicón del gen *nef* con

las enzimas *XhoI* y *KpnI* representan un obstáculo tanto en el proceso de ligación como en los procesos de transcripción *in vitro* y, potencialmente, de su traducción. La digestión con la ER *XhoI* puede producir plásmidos recombinantes portando no sólo el gen *nef* completo sino también truncado, mientras que la digestión con *KpnI*, la cual es la enzima utilizada obligatoriamente para linearizar el plásmido en este sistema, también fragmentaría el gen de interés favoreciendo la aparición de transcritos incompletos (ver FIGURA 2). Estos resultados concuerdan con lo planteado por Shivprasad *et al.* (1999), quienes explicaron que la adición de un sitio *XhoI* dentro del gen *gfp* permite escindirlo en uno o dos fragmentos según el orden en que se utilicen las ERs. No obstante, este sistema tal como está planteado interfiere con el clonaje de genes de interés que porten la secuencia de restricción para *XhoI*, como ocurrió en el presente trabajo.

Estos resultados en conjunto dejan en evidencia la utilidad que tiene el método de extensión solapada por PCR para solucionar problemas asociados con la presencia de sitios de restricción en regiones de un inserto o de un vector, distintas a las destinadas para su ligación. Sin embargo, la introducción de mutaciones sitio-dirigidas mediada por PCR ha tenido mayor aplicabilidad en los estudios de caracterización de dominios funcionales específicos en polipéptidos de interés médico-científico. Por ejemplo, investigaciones acerca de mutantes sitio dirigidos de Nef en el motivo (K⁹²EK), revelaron que este dominio efector es necesario para inducir la producción y liberación de las chemokinas MIP-1 α y MIP-1 β en macrófagos

infectados (Dai y Steveson, 2010). Así mismo Aqil *et al.* (2013), lograron determinar a partir de ensayos de mutagénesis del motivo $GW_{(12,13/140,141)}$ de Nef, el papel que desempeñan estos residuos de aminoácidos en la supresión del silenciamiento viral mediado por el complejo Ago2-RISC; y el efecto que desencadenan estas alteraciones sobre la carga viral y la infectividad ocasionada por el VIH-1. Otros trabajos en los cuales se ha empleado la estrategia de mutagénesis sitio-dirigida, son el estudio de la actividad fibrinolítica de una serín proteasa extraída de glándulas salivales de una serpiente marina (*Lapemis hardwickii*), la cual ha mostrado amplio espectro de aplicación en medicina, pero bajo rendimiento en sistemas eucarióticos (levaduras). Los resultados de este trabajo revelaron que la enzima doble mutante (N111R/R230G) alcanzó altos niveles de expresión en *Pisichia pastoris* y una actividad anti-trombótica e hipotensora aumentada en ratas hipertensas espontáneas (Li *et al.*, 2017). Así mismo, se han reportado ensayos de producción de la enzima dealquilasa humana cuyo producto se encarga de reparar daños en el ADN ocasionados por agentes alquilantes (Silvestrov *et al.* 2014); la expresión de la proteína B mutante la cual se une a la transferrina porcina para inducir respuesta inmune contra *Haemophilus parasuis* (Frاندoloso *et al.* 2015); o la estandarización de la estrategia de mutagénesis sitio-dirigida por PCR con el método de QuikChange™ (Agilent Technologies La Jolla, CA, USA), en la que se emplean cebadores individuales en reacciones separadas para amplificar cada una de las hebras de la secuencia de interés.

No obstante, estos datos contrastan lo reportado inicialmente por Ho *et al.* (1989), quienes postularon que la principal limitante de la SDM radica en la incapacidad que tiene el método para provocar alteraciones en el interior de la secuencia blanco. Este grupo afirmó que los cambios sólo son posibles siempre y cuando los cebadores mutagénicos estén dirigidos hacia los extremos del ADN clonado. Por lo tanto, con la estrategia desarrollada en el presente trabajo quedó demostrado el alcance que puede tener este método cuando se planifica una estrategia experimental adecuada.

El desarrollo evidente de síntomas en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con ARN viral quimérico del vector p30B modificado, fue posible luego de un período de incubación de 60 días posteriores a su inoculación. No obstante, diversos ensayos donde se han utilizado éste u otros vectores virales similares para expresar proteínas de interés médico, señalan que la aparición de síntomas ocurre en un plazo no mayor a catorce días luego de inoculadas las plantas (Yusibov *et al.* 1997; Marusic *et al.* 2001; Donini *et al.* 2005; Meyers *et al.* 2008; Hwang *et al.* 2012; Alkanaimsh *et al.* 2016). Este retraso observado en la aparición de síntomas probablemente está influenciado por las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrollaron las plantas inoculadas; ya que, a pesar de haberse controlado y ajustado parámetros climáticos como fotoperíodo de 16:8 horas luz: oscuridad y termoperíodo ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), el material tratado no alcanzó ni la altura ni el diámetro de la lámina foliar suficiente como para manifestar un desarrollo de síntomas perceptibles, aún a los catorce días de su

inoculación. Dentro de los síntomas predominantes desarrollados por las plantas se encuentran ampollas, distorsión de la lámina foliar y moteado; indicios de infección aparentemente virales de amplia ocurrencia en Tobamovirus (Solis & García-Arenal 1990; Rodríguez *et al.* 2004; Ortega *et al.* 2007); sin embargo, otros síntomas tales como clorosis y moteado se presentaron en un número más limitado de plantas y en éste último caso luego de un período de incubación de 60 días. Independientemente del tipo y la magnitud de los síntomas desarrollados por el material utilizado en el presente estudio, estos resultados concuerdan con los reportados por otros investigadores que han empleado el sistema de expresión de péptidos heterólogos basado en la familia de vectores virales 30B (Shivprasad *et al.* 1999; Ryabov *et al.* 1999; Kohl *et al.* 2006; Kagale *et al.* 2012; Mascia *et al.* 2014). En este sentido, se debe señalar que el genoma de los vectores de virus de plantas se han manipulado adecuadamente; de forma tal que se favorezca el desarrollo de síntomas de infección sistémica tipo mosaico, moteado y menos frecuentemente clorosis; en contraposición a la aparición de manifestaciones que impliquen respuesta hipersensible, reducción de la lámina foliar o pérdida total de la misma. Éstas últimas premisas tienen una noción bastante lógica, ya que estos vectores se emplean en estrategias cuyo propósito es expresar péptidos heterólogos que se producen, modifican, compartimentalizan y almacenan en tejidos vegetales. Por otra parte, la aparición tardía de síntomas característicos

de infecciones ocasionadas por virus luego de un período de incubación de 60 días resulta un parámetro impráctico para un sistema de producción que tiene como propósito producir a gran escala proteínas recombinantes en un período corto de tiempo.

Los resultados de los ensayos de RT-PCR realizados a partir de plantas inoculadas con ARN viral quimérico desarrollado "*in vitro*", permitieron amplificar y evidenciar que 7 de las 21 plantas tratadas resultaron positivas para los genes codificantes de la proteína auxiliar Nef del VIH-1, la proteína de cápside del TMGMV y la proteína de replicación viral del TMV. No obstante, la intensidad de la señal para los genes *pc* y *rdrp* fue mucho mayor que la obtenida para el gen *nef*. Estos resultados sugieren que de alguna manera el virus quimérico ejerce algún tipo de presión para multiplicar diferencialmente su genoma y favorece la replicación de aquellos genes que son determinantes para su biología. En este sentido, Lombardi *et al.* (2009) demostraron que los bajos niveles de expresión de Nef en plantas de *N. benthamina* agroinfiltradas, están modulados por un mecanismo de silenciamiento dirigido por pequeños ARN interferentes específicos de Nef producidos por la planta. Esta estrategia de silenciamiento génico post-transcripcional forma parte de la respuesta innata que han desarrollado las plantas como defensa contra ácidos nucleicos invasivos de transgenes, transposones y transcriptos virales (Jovel & Ramírez 2002; Baulcombe 2004; Flores *et al.* 2005; Alvarado & Scholthof 2009).

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede señalar que la estrategia metodológica diseñada y ejecutada, permitió construir un vector de virus de planta constituido por genes provenientes de los virus del mosaico del tabaco (TMV), del mosaico verde suave del tabaco (TMGMV) y de inmunodeficiencia humana (HIV). El desarrollo de esta quimera viral fue posible gracias al método de mutagénesis sitio-dirigida, el cual permitió solventar el problema relacionado con la presencia de los sitios de restricción que estaban afectando los procedimientos de ligación del gen *nef* con el vector p30B, la linearización del vector una vez modificado y la transcripción “*in vitro*” del vector linearizado. Finalmente, esta quimera se considera una herramienta biotecnológica que puede ser empleada en la producción de una vacuna potencial dirigida a contrarrestar las primeras etapas de la infección por HIV-1.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado parcialmente por el FONACIT (proyecto PEI N° 2102001279).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkanaimsh S., Karuppanan K., Guerrero A., Tu A., Hashimoto B., Hwang M., Phu M., Arzola L., Lebrilla C., Dandekar A., Falk B., Nandi S., Rodríguez R., McDonald K. 2016. Transient expression of tetrameric recombinant human butyrylcholinesterase in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science* doi:10.3389/fpls.2016.00743.
- Alvarado V., Scholthof H. 2009. Plant responses against invasive nucleic acids: RNA silencing and its suppressions by plant viral pathogens. *NIH Public Access* 20(9):1032-1040.
- Aqil Madeeha., Naqvi A., Bano A., Jameel S. 2013. The HIV-1 Nef protein Argonaute-2 and functions as a viral suppressor of RNA interference. *PLoS ONE* 8(9): e74472. doi:10.1371/journal.pone.0074472.
- Avesani L., Marconi G., Morandini F., Albertini E., Bruschetta M., Bortesi L., Pezzoti M., Porceddu A. 2007. Stability of Potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic Res.* 16:587-597.
- Azad A., Failla P., Lucantoni A., Bentley J., Mardon C., Wolfe A., Fuller K., Hewish D., Macreadie I. 1994. Large-scale production and characterization of recombinant human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J. Gen. Virol.* 75:651-655.

- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431(16):356-363.
- Barbante A., Irons S., Hawes C., Frigerio L., Vitale A., Pedrazzini E. 2008. Anchorage to the cytosolic face of the ER membrane: a new strategy to stabilize a cytosolic recombinant antigen in plant. *Plant Biotechnol. J.* 6:560-575.
- Cammack N. 1995. HIV-nef: Is it a therapeutic target? *Publicación Oficial de la Sociedad Española Interdisciplinaria del SIDA* 6:160.
- Carter J., Saunders V. 2007. *Virology: Principles and Applications*. UK, John Wiley & Sons Ltd. 383 p.
- Carter P. 1986. Site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal* 237:1-7.
- Chung C., Niemela S., Miller R. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 86:2172-2175.
- Craik C. 1985. Use of oligonucleotides for site-specific mutagenesis. *BioTechniques* 3:12-19.
- Dai L., Stevenson M. 2010. A novel motif in HIV-1 Nef that regulates MIP- β 1 chemokine release in macrophages. *Journal of Virology* 84(16):8327-8331.
- Deacon N., Tsykin A., Solomon A., Smith K., Ludord-Menting M., Hooker D., McPhee D., Greenway A., Ellett A., Chatfield C., Lawson V., Crowe S., Maerz A., Sonza S., Learmont J., Sullivan J., Cunningham A., Dwyer D., Dowton D., Mills J. 1995. Genomic structure of an attenuated quasi-species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270:988-991.
- de Virgilio M., De Marchis F., Bellucci M., Mainieri D., Rossi M., Benvenuto E., Arcioni S., Vitale A. 2008. The human immunodeficiency virus antigen Nef forms protein bodies in leaves of transgenic tobacco when fused to zeolin. *Journal of Experimental Botany* 59(10):2815-2829.
- Donini M., Lico Ch., Baschieri S., Conti S., Magliani W., Polonelli L., Benvenuto E. 2005. Production of an engineered killer peptide in *Nicotiana benthamiana* by using a *Potato Virus X* expression system. *Applied and Environmental Microbiology* 71(10):6360-67.
- Dubé M., Bego M., Paquay C., Cohen É. 2010. Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology* 7(114):1-19.
- Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. 2005. *Virus Taxonomy-Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, California, Elsevier Academic Press, p. 1273.
- Flint S. J., Enquist L. W., Racaniello V. R., Skalka A. M. 2004. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control of Animal Viruses*. Second Edition. Washington DC, ASM Press, p. 918.

- Flores R., Hernández C., de Alba Martínez A., Daros J., Di Serio F. 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:117-139.
- Frاندoloso R., Martínez-Martínez S., Calmettes Ch., Fegan J., Costa E., Curran D., Yu R., Gutierrez-Martín C., Rodríguez-Ferry E. F., Moraes T., Schryvers A. 2015. Nonbinding site-directed mutants of transferrin binding protein B exhibit enhanced immunogenicity and protective capabilities. *Infection and Immunity* 83:1030-1038.
- Geyer M., Peterlin B. 2001. Domain assembly accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef. *FEBS Letters* 49:91-95.
- Geyer M., Munte C., Schorr J. Kellner R., Kalbitzer R. 1999. Structure of the anchor-domain of myristoylated and no-myristoylated HIV-1 Nef protein. *Journal of Molecular Biology* 289(1):123-138.
- Goepfert P., Tomaras G., Horton H., Montefiori D., Ferrari G., Deers M., Voss G., Koutsoukos M., Pedneault L., Vandepapeliere P., McElrath M., Spearman P., Fuchs J., Koblin B., Blattner W., Frey S., Baden L., Harro C., Evans T. 2007. NIAID HIV vaccine trials network. Durable HIV-1 antibody and T-cell responses elicited by an adjuvanted multi-protein recombinant vaccine in uninfected human volunteers. *Vaccine* 25:510-518.
- Hall L., Emery D. 1991. Rapid and efficient method for site-directed mutagenesis by PCR using biotinylated universal primers and streptavidin-coated magnetic beads. *Protein Engineering* 4:601.
- Ho S., Hunt H., Horton R., Pullen J., Pease L. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-9.
- Hwang M., Lindenmuth B., McDonald K., Falk B. 2012. Bipartite and tripartite *Cucumber mosaic virus*-based vectors for producing the *Acidothermus cellulolyticus* endo-1,4- β -glucanase and other proteins in non-transgenic plants. *BioMed Central Biotechnology* doi: 10.1186/1472-6750-12-66.
- Jovel J., Ramírez P. 2002. Silenciamiento de genes virales: el contraataque de las plantas frente a infecciones de virus fitopatógenos. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66:49-61.
- Kagale S., Shihomi U., Wigness M., Bender T., Yang W., Borhan H., Rozwadowski K. TMV-gate vectors: Gateway compatible tobacco mosaic virus based expression vectors for functional analysis of protein. 2012. *Scientific Reports* doi:10.1038/srep00874.
- Kohl T., Hitzeroth I., Stewart D., Varsani A., Govan V., Christensen A., Williamson A., Rybicki E. 2006. Plant-produced Cottontail rabbit papillomavirus L1 protein protects against tumor challenge: a proof-of-concept study. *Clinical and Vaccine Immunology* 13(8):845-853.

- Kohleisen B., Gaedigk-Nitschko K., Ohlmann M., Götz E., Ostolasa H., Goni F., Erfle V. 1996. Heparin-binding capacity of the HIV-1 NEF-protein allows one-step purification and biochemical characterization. *J. Virol. Methods* 60:89-101.
- Li Z., Chen X., Guo S., Zhang H., Dong H., Wu G., Hong A., Gu J. 2017. Engineering of Harobin for enhanced fibrinolytic activity obtained by random and site-directed mutagenesis. *Protein Expr Purif.* 129:162-172
- Lombardi R., Circelli P., Villani M., Buriani G., Coppola V., Bianco L., Benvenuto E., Donini M., Marusic C. 2009. High-level HIV-I Nef transient expression in *Nicotiana benthamiana* using the P19 gene silencing suppressor protein of Artichoke Mottled Crinckle Virus. *BioMed Central* doi:10.1186/1472-6750-9-96.
- Maggiorella M., Sernicola L., Crostarosa F., Belli R., Pavone-Cossut M., Macchia I., Farcomeni S., Tenner-Racz K., Racz P., Ensoli B., Titti F. 2007. Multiprotein genetic vaccine in the SIV-Macaca animal model: a promising approach to generate sterilizing immunity to HIV infection. *J. Med. Primatol.* 36:180-194.
- Malim M., Emerman M. 2008. HIV-1 accessory proteins-ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host & Microbe Review* 3:388-398.
- Marusic C., Rizza P., Lattanzi L., Mancini C., Spada M., Belardell, F., Benvenuto E., Capone I. 2001. Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology* 75(18):8434-9.
- Marusic C., Nttal J., Buriani G., Lico Ch., Lombardi R., Baschieri S., Benvenuto E., Frigerio L. 2007. Expression, intracellular targeting and purification of HIV Nef variants in tobacco cells. *BioMed Central Biotechnology* doi:doi:10.1186/1472-6750-7-12.
- Marusic C., Vitale A., Pedrazzini E., Donini M., Frigerio L., Block R., Dix Ph., McCabe M., Bellucci M., Benvenuto E. 2009. Plant-based strategies aimed at expressing HIV antigens and neutralizing antibodies at high levels. Nef as a case study. *Transgenic Research* 18:499-512.
- Mascia T., Nigro F., Abdallah A., Ferrara M., De Stradis A., Faedda R., Palukaitis P., Gallitelli D. 2014. Gene silencing and gene expression in phytopathogenic fungi using a plant virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111(11):4291-4296.
- Meyers A., Chakauya E., Shephrad E., Tanzer F., Maclean J., Lynch A., Williamson A., Rybicki E. 2008. Expression of HIVI antigens in plants as potential subunit vaccines. *BioMed Central Biotechnology* doi:10.1186/1472-6750-8-53.
- Michael N. L., Chang G., d'Arcy L. A., Ehrenberg P. K., Mariani R., Busch M. P., Birx D. L., Schwartz D.H. 1995. Defective accessory genes in a human

- immunodeficiency virus type 1-infected long-term survivor lacking recoverable virus. *Journal of Virology* 69:4228-4236.
- Nassal M., Rieger A. 1990. PCR-based site-directed mutagenesis using primers with mismatched 3'-ends. *Nucleic Acids Research* 18:3077-3078.
- Noguera A., Fermín G. 2013. Plataformas de expresión en plantas de péptidos humanos terapéuticos: expresión transitoria y estable. *Avances en Biomedicina* 2(3):137-153.
- Ortega E., Zambrano K., Carballo O., Romano M., Marys E. 2007. Caracterización de un Tobamovirus aislado de plantas de canavalia (*Canavalia ensiformis* L.) en una parcela experimental del Edo. Aragua, Venezuela. *Interciencia* 32(3):202-205.
- Parreira R., Pádua E., Piedade J., Venenno T., Paixão M. T., Esteves A. 2005. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef in Portugal: subtyping, identification of mosaic genes, and amino acid sequence variability. *Journal of Medical Virology* 77:8-16.
- Rangel H. R., Garzaro D., Rodríguez A. K., Ramírez A. H., Ameli G., Gutiérrez C., Pujol F. H. 2009. Deletion insertion and stop codon mutations in *vif* genes of HIV-1 infecting slow progressor patients. *The Journal of Infection in Developing Countries* 3:531-538.
- Ratner L., Joseph T., Bandres J., Ghosh S., Vander Heyden N., Templeton A., Hahn B., Powderly W., Arens M. 1996. Sequence heterogeneity of Nef transcripts in HIV-1-infected subjects at different stages of disease. *Virology* 223:245-250.
- Rodríguez Y., Rangel E., Centeno F., Mendoza O., Parra A. 2004. Detección de enfermedades virales afectando al pimentón en los municipios Iribarren, Jiménez y Torres del estado Lara, Venezuela, utilizando la técnica ELISA. *Rev. Fac. Agron.* 21(2):105-115.
- Roeth J., Collins K. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:548-563.
- Ryabov E., Robinson D., Talianski M. 1999. A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1212-1217.
- Salmen S., Colmenares M., Peterson D., Reyes E., Rosales J., Berrueta L. 2010. HIV-1 Nef associates with p22-phox, a component of the NADPH oxidase protein complex. *Cellular Immunology* 263:166-171.
- Salmen S., Gabaldon-Figueira J., Terán-Ángel G. 2015. Nef-VIH-1 como principal orquestador de la disfunción celular durante la inmunopatogenia de la infección por el VIH-1. *Avances en Biomedicina* 4:126-137.

- Sambrook J., Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Shivprasad S., Pogue G., Lewandowski D., Hidalgo J., Donson J., Grill L., Dawson W. 1999. Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology* 255:312-323.
- Shugars D., Smith M., Glueck D., Nantermet P., Moiseiwitsch F., Swanstrom R. 1993. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef gene sequences present in vivo. *Journal of Virology* 67:4639-4650.
- Silvestrov P., Müller T., Clark K., Hausinger R., Cisneros A. 2014. Homology mode-ling, molecular dynamics, and site-directed mutagenesis study of AlkB human homo- log 1 (ALKBH1). *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 54:123-30.
- Sirén N., Weegar J., Dahlbacka J., Kalkkinen N., Fagervik K., Leisola M., vonWeymarn N. 2006. Production of recombinant HIV-1 Nef (negative factor) protein using *Pichia pastoris* and a low-temperature fed-batch strategy. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 44:151-158.
- Solis I., García-Arenal F. 1990. The complete nucleotide sequence of the genomic RNA of the Tobamvirus Tobacco Mild Green Mosaic Virus. *Virology* 177:553-558.
- Terán-Ángel G., Montes-Berrueta D., Valencia-Molina J., Gabaldon-Figueira J., Bastidas-Azuaje M., Peterson D., Berrueta L., Salmen S. 2016. Identification of Nef-HIV-1 domains involved in p22-phox interaction and superoxide production. *Invest. Clin.* 57(3):303-317.
- Tobiume M., Takahoko M., Yamada T., Tatsumi M., Iwamoto A., Matsuda M. 2002. Inefficient enhancement of viral infectivity and CD4 downregulation by human immunodeficiency virus type 1 Nef from Japanese long-term nonprogressor. *Journal Virology* 76:5959-5965.
- Vallette F., Mege E., Reiss A., Adesnik M. 1989. Construction of mutant and chimeric genes using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* 17:723-33.

- Van Marle G., Henry S., Todoruk T., Sullivan A., Silva C., Rourke S. B., Holden J., McArthur J. C., Gill M. J., Power C. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein mediates neural cell death: a neurotoxic role for IP-10. *Virology* 329:302-318.
- Weiner M., Felts K., Simcox T., Braman J. 1993. A method for the site-directed mono-and multi-mutagenesis of double-stranded DNA. *Gene* 126:35-41.
- Weiner M., Costa G., Schoettlin W., Cline J., Mathur E., Bauer J. 1994. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* 151:119-123.
- Xia Y., Chu W., Qi Q., Xun L. 2015. New insights into the QuikChange™ process guide the use of Phusion DNA polymerase for site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Research* 43:e12.
- Yang X., Gabuzda D. 1998. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and regulates the HIV-1 Vif protein. *J. Biol. Chem.* 273:29879-29887.
- Yao Z., Jones D., Grose C. 1992. Site-directed mutagenesis of herpes-virus glycoprotein phosphorylation sites by recombinant polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl.* 1:205-207.
- Yoshino Y., Ishida M., Horii A. 2007. A new 10-min ligation method using a modified buffer system with a very low amount of T4 DNA ligase: the “Coffee Break Ligation” technique. *Biotechnol Lett.* 29:1557-1560.
- Yusibov V., Modelska A., Steplewski K., Agadjanyan M., Weiner D., Hooper D., Koprowski H. 1997. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies viruses and HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:5784-8.
- Zhou F., Badillo-Corona J., Karcher D., González-Rabade N., Piepenburg K., Borchers A., Maloney A., Kavanagh T., Gray J., Bock R. 2008. High-level expression of HIV antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant Biotechnol. J.* 6:897-913.