

*“Construcción y expresión de una proteína  
de fusión C-terminal entre la cadena kappa  
del anticuerpo 14D9 y una proteína  
fluorescente roja”*

***Gonzalez, Cintia Daniela***

Trabajo de Tesis de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular

Directora

Dra. Silvana Petruccelli

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de  
Alimentos (CIDCA), CONICET-CIC-UNLP

*Universidad Nacional de La Plata*

*Facultad de Ciencias Exactas*



**La Plata, diciembre de 2010**

## *Agradecimientos*

- *A mis padres por su compañía, cariño y educación, y por esforzarse tanto para darme la posibilidad de estudiar.*
- *A mis hermanas que las quiero con toda mi alma y a toda mi familia (primos/as, tíos/as y abuelo/as) por su amor incondicional.*
- *A mis amigos y amigas de la Facultad con los que he compartido momentos hermosos e inolvidables durante estos años.*
- *A mis hermanas del alma Claudia, Lucia, Miriam y Lorena.*
- *A la Facultad de Ciencias Exactas, por todo el conocimiento brindado.*
- *A Silvana Petruccelli por confiar en mí y permitirme ingresar a su grupo de trabajo.*
- *A los chicos del Laboratorio por la buena onda y en especial a Silvina y a Fabricio por la paciencia que me tuvieron y todo lo que me ayudaron durante el desarrollo de este trabajo.*
- *Al jurado: Eugenia Zanetti, Laura Lopez y Dana Martinez, por su buena predisposición para la lectura y evaluación de este trabajo.*

**ÍNDICE**

<b><u>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</u></b>	1
<b>1. Anticuerpos</b>	2
1.1. Estructura de las inmunoglobulinas	2
1.2. El proceso de síntesis, ensamblado y secreción de inmunoglobulinas	4
1.3. Anticuerpos completos utilizados en terapia humana	5
1.4. Los sistemas de producción de anticuerpos terapéuticos a nivel comercial	8
<b>2. Las plantas como sistema de producción de proteínas heterólogas</b>	11
2.1. Ventajas y desventajas con respecto a otros sistemas de producción	12
2.2. Secuencias regulatorias empleadas al expresar genes en plantas y sus efectos en los niveles de acumulación.	15
2.2.1. Secuencias que determinan la eficiencia de los procesos de transcripción y/o traducción.	15
2.2.2. Procesamiento co y post-traducciona l y su importancia en la obtención de productos con actividad biológica	17
2.3. Formatos que pueden emplearse para la síntesis de proteínas en plantas	18
2.3.1. Planta entera: sistemas de expresión estable y transitoria	18
2.3.2. Cultivo de células vegetales	19
2.4. La síntesis de anticuerpos empleando en plantas	20
<b>3. La síntesis de proteínas en la vía secretoria de células vegetales</b>	21
3.1. Características particulares de la vía secretoria de células vegetales	21
3.2. Estrategias que pueden emplearse en el estudio de la vía secretoria	23
<b>4. Estrategias que pueden emplearse para incrementar la acumulación de proteínas recombinantes.</b>	27
4.1. Estrategias empleadas en plantas	27
4.2. Estrategias empleadas en otros sistemas de expresión.	29
<b><u>CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u></b>	30
<b>Construcción de la hipótesis de trabajo y objetivos del trabajo</b>	31
<b>Hipótesis</b>	31
<b>Objetivos</b>	32
<b><u>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	33
<b>1 Materiales</b>	34
1.1 Material biológico	34
1.2 Medios de cultivos para bacterias	35
1.3 Soluciones de antibióticos empleadas	35
1.4 Vectores plasmídicos utilizados	35
1.5 Primers utilizados	36
1.6 Herramientas utilizadas para el análisis de secuencia y el diseño de los primers	36
1.7 Enzimas recombinantes	37
<b>2. Metodologías</b>	38
2.1 Reacciones de PCR	38
2.2 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	39
2.3 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa utilizando un kit comercial (HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Mini-kit, RealGenomics™)	39
2.4 Clonado en pENTR™/TEV-TOPO (Invitrogen)	40
2.5 Recombinación sitio específica mediante el sistema Gateway (LR clonasa)	40
2.6 Transformación química de células competentes de E.coli DH5-α y 1 One Shot® Chemically Competent E. coli (Invitrogen)	41
2.7 Minipreparación de DNA plasmídico	41
2.8 Diálisis de DNA	42
2.9 Digestiones enzimáticas	42
2.10 Colony-PCR	43
2.11 Transformación de A. tumefaciens	43
2.12 Agroinfiltración de plantas de A. thaliana y N. banthamiana	44
2.13 Microscopía de disección fluorescente y microscopía de fluorescencia confocal	44

<b><u>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b>	45
<b>1. Diseño experimental</b>	46
1.1 Análisis de las secuencias y diseño de primers	50
<b>2. Construcción de la fusión kappa-PF</b>	51
2.1 Primera etapa: amplificación de los genes a ser fusionados	51
2.2 Segunda etapa: PCR de fusión	52
<b>3. Clonado</b>	54
3.1 Clonado en pENTR/TEV/D-TOPO. Reacción TOPO	54
3.1.1 Screening de los clones obtenidos	55
3.1.2 Digestiones enzimáticas	56
3.2 Clonado en el vector de expresión, pGWB2	57
3.2.1 Screening de los clones obtenidos	58
<b>4. Evaluación de la funcionalidad de las construcciones obtenidas</b>	59
<b>5. Localización subcelular de las Kappa-mCherry y Kappa- tD Tomato en células de epidermis de <i>N. benthamiana</i></b>	61
<b>6. Localización subcelular de las Kappa-mCherry y Kappa- tD Tomato en presencia de Gamma-YFP</b>	64
6.1. Localización subcelular en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	65
6.2. Localización subcelular en hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan en forma estable Gamma-YFP	68
<b><u>CAPÍTULO V: CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS</u></b>	70
<b>Conclusión general</b>	71
<b>Perspectivas</b>	72
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	73
<b><u>ANEXO</u></b>	86
Anexo 1.1: Secuencia de KaKDEL utilizada para el diseño del primer Reverso-Fusión	87
Anexo 1.2: Alineamiento global de las secuencias codificantes de mCherry y tD Tomato	88
Anexo 1.3: PCR virtual para la amplificación de PS-Kappa utilizando los primers: Forward-PS y Reverso-Fusión	89
Anexo 1.4: Mapa de los vectores de clonado obtenidos para cada construcción	90

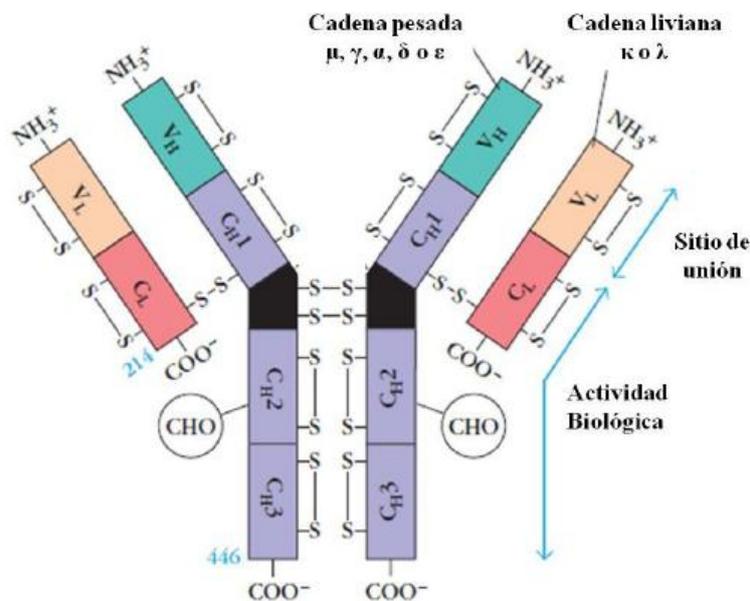
# **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1. Anticuerpos

#### 1.1. Estructura de las inmunoglobulinas

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son moléculas producidas por las células B, las cuales reconocen un amplio espectro de especificidades de antígeno y cada célula produce una inmunoglobulina de especificidad única. Funcionan como la parte específica del denominado complejo receptor de células B (BCR) reconociendo al antígeno a nivel de la membrana del linfocito B, y como moléculas circulantes secretadas por las células plasmáticas procedentes de la activación, proliferación y diferenciación de células B. Estructuralmente están formados por dos cadenas polipeptídicas pesadas H (*Heavy*) y dos cadenas ligeras L (*Light*) unidas entre sí mediante enlaces covalentes (Figura 1) (Goldsby y col., 2002; Edelman, 1991). Las cadenas ligeras consisten en una región variable (VL) y una constante (CL) mientras

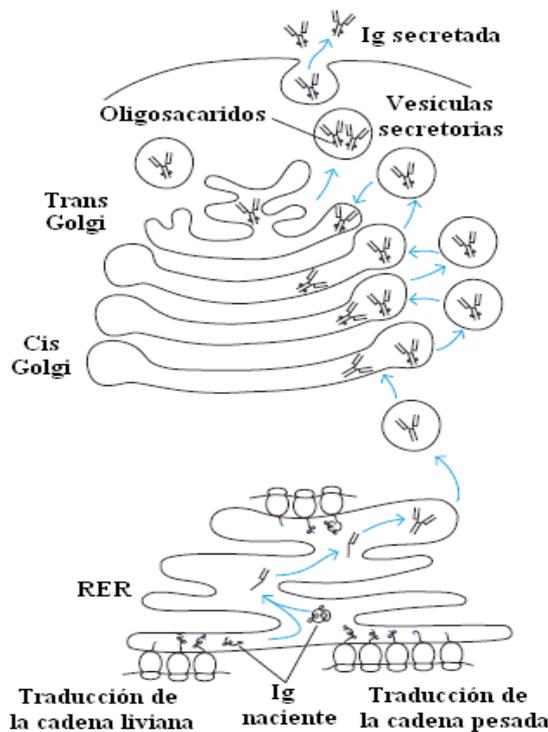


**Figura (1.1)** *Diagrama esquemático de la estructura de las inmunoglobulinas.* Cada cadena liviana y pesada contiene una región variable (V) amino terminal (mostrada en marrón claro y verde respectivamente). El resto de cada cadena constituye la región constante (C) carboxilo terminal (mostrada en rojo y púrpura), esta región exhibe una variación que determina los dos subtipos de cadenas livianas ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) y los cinco subtipos de cadenas pesadas ( $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  o  $\epsilon$ ). Fuente: *Immunology fifth edition (2002)*.

que las pesadas, de una Ig típica, presentan una región variable (VH) y tres constantes (CH1, CH2, CH3). Funcionalmente podemos distinguir dos porciones en los anticuerpos: una de ellas implicada en el reconocimiento y unión al antígeno denominada región Fab (*antigen binding Fragment*) y otra involucrada en las funciones efectoras de los anticuerpos llamada región Fc (*crystallizable Fragment*). El sitio de unión al antígeno está constituido por las regiones variables de ambas cadenas, y consta de 110- 130 aminoácidos. En las regiones variables de ambas cadenas pueden distinguirse 3 zonas de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Existen cinco clases diferentes de anticuerpos, que se diferencian entre sí por una serie de cambios estructurales que les confieren diferentes funciones en el organismo. Los cinco tipos principales de inmunoglobulinas son: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE y sus cadenas pesadas se nombran con la correspondiente letra griega minúscula ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\epsilon$ , respectivamente). La IgG es la más abundante y posee varias subclases (IgG1, 2, 3 y 4 en seres humanos). En las moléculas de anticuerpos se pueden encontrar dos tipos de cadenas livianas: lambdas ( $\lambda$ ) o kappas ( $\kappa$ ). Cada inmunoglobulina contiene solo un tipo de cadena liviana,  $\lambda$  o  $\kappa$ . No se han encontrado diferencias funcionales entre los anticuerpos que poseen cadenas  $\lambda$  o  $\kappa$ , y ambos tipos pueden hallarse en anticuerpos de los 5 isotipos principales. Cada cadena liviana está unida a una cadena pesada por un puente disulfuro, y las interacciones no covalentes como uniones salinas, puentes de hidrogeno, e interacciones hidrofóbicas, estabilizan la estructura del heterodímero (H-L). La unión de dos heterodímeros idénticos mediante interacciones similares da lugar a la inmunoglobulina dimérica compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas. Las inmunoglobulinas presentan cuatro niveles de organización estructural, las cadenas polipeptídicas forman principalmente estructuras  $\beta$ -plegada, que se pliegan en tres dominios globulares interconectados. Esta organización le confiere al anticuerpo una forma similar a una Y, consistente en tres segmentos conectados por una región flexible, denominada región bisagra, la cual une las porciones Fc y Fab permitiendo el movimiento independiente de ambos brazos (Gerstein y col., 1994). Los anticuerpos son proteínas glicosiladas, en las cuales los sitios de anclaje de los carbohidratos, con algunas excepciones, se encuentran restringidos a la región Fc, en particular el CH2.

**1.2. El proceso de síntesis, ensamblado y secreción de inmunoglobulinas**

La transcripción de los genes de las cadenas liviana y pesada da lugar a transcritos primarios que contienen intrones. El procesamiento postranscripcional (RNA *splicing*) es requerido para dar lugar al mRNA funcional. Los cuales, una vez protegidos en ambos extremos 5' y 3', son exportados al citoplasma donde serán traducidos a las cadenas polipeptídicas correspondientes, L o H en cada caso. Una inmunoglobulina puede existir en dos formas, secretada o unida a la membrana, las cuales difieren en la secuencia aminoacídica carboxi-terminal de la cadena pesada. En la forma de membrana, la molécula de inmunoglobulina posee un dominio transmembrana



**Figura (1.2).** Síntesis, ensamblado, y secreción de las moléculas de inmunoglobulinas: Las cadenas liviana y pesada son sintetizadas en distintos polisomas. En el interior del retículo endoplasmático rugoso tiene lugar el ensamblado de la inmunoglobulina mediante la formación de los puentes disulfuro correspondientes. Posteriormente el anticuerpo será movilizado hacia el aparato de Golgi y transportado al medio extracelular a través de vesículas secretorias. Fuente: *Immunology fifth edition (2002)*.

hidrofóbico de alrededor de 25 aminoácido, que la ancla a la superficie del linfocito B. Este dominio transmembrana está ausente en la forma secretada, cuyo dominio carboxi-terminal es una cola hidrofílica que no se retiene. Los dos extremos carboxi-terminales diferentes de las formas transmembrana y secretada están codificados en exones separados y la producción de ambas formas se produce por procesamiento alternativo del mRNA (Rogers y col., 1980; Early y col., 1980; Peterson y col., 1991). Una vez en el citoplasma de la célula, comienza la traducción de los mRNAs de las cadenas liviana y pesada que tiene lugar en polisomas independientes. La presencia de la señal de direccionamiento a retículo (péptido señal) provoca la traslocación del péptido nascente

hacia el interior del retículo endoplasmático rugoso (RER), posteriormente el péptido señal será eliminado por una peptidasa. En el lumen del RER las cadenas L y H son ensambladas mediante la formación de los puentes disulfuro correspondientes, y las inmunoglobulinas son glicosiladas con patrones característicos. Las moléculas completas son transportadas al aparato de Golgi y luego a vesículas secretorias, que se fusionan con la membrana plasmática (Figura 2). El orden en el que las cadenas son ensambladas varía según el tipo de inmunoglobulinas. En el caso de IgG, se ensamblan dos cadenas H, luego se forma un intermediario  $H_2L$ , y finalmente la molécula completa  $H_2L_2$ . Si la molécula contiene la secuencia transmembrana, la misma se ancla en el sistema de endomembranas y la fusión de las vesículas transportadoras con la membrana plasmática dará lugar a la formación del receptor BCR. Si, en cambio, la molécula contiene la secuencia hidrofílica de las inmunoglobulinas secretadas queda en el lumen del retículo endoplásmico, será transportada como una molécula libre dentro de las vesículas transportadoras y al fusionarse estas con la membrana plasmática, la inmunoglobulina será liberada al medio extracelular.

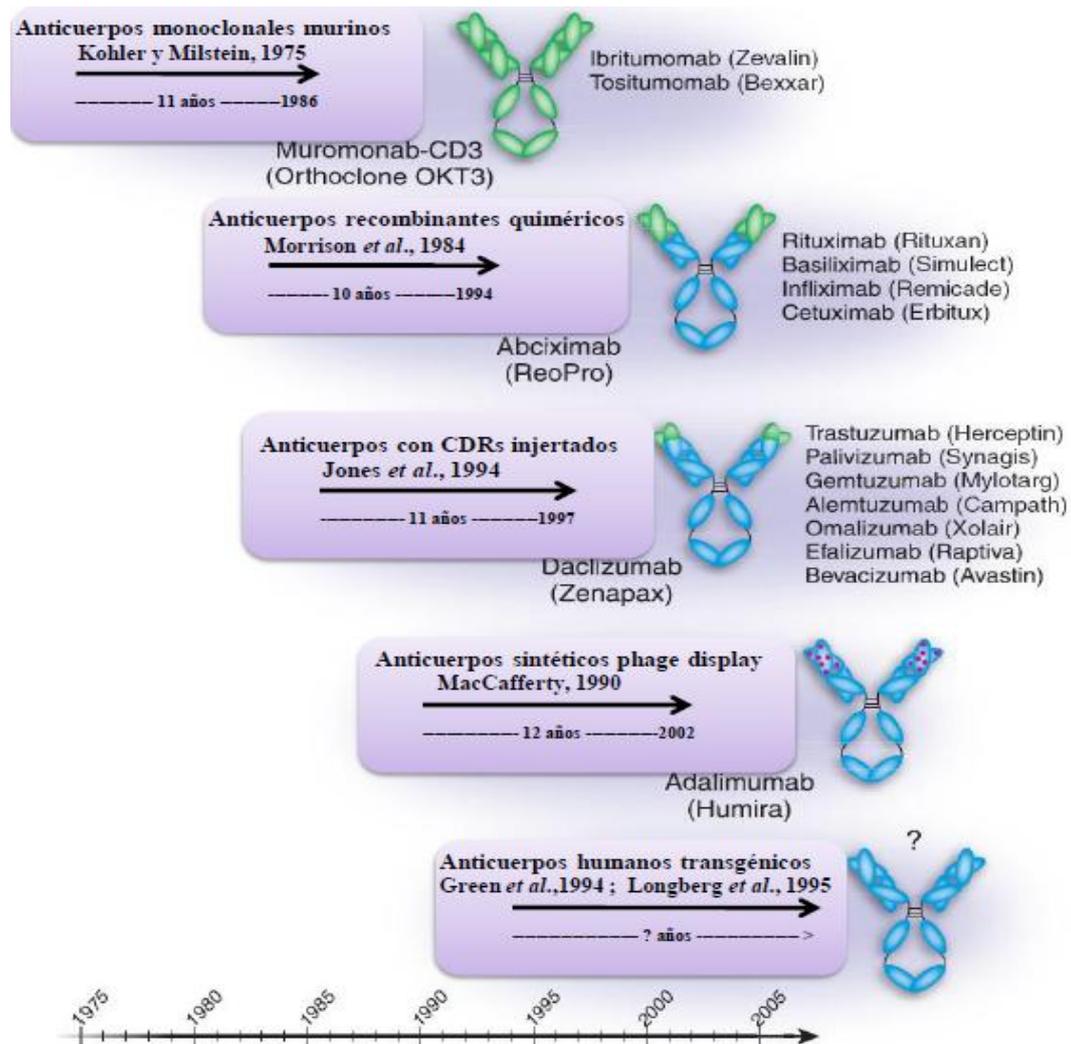
### ***1.3. Anticuerpos completos utilizados en terapia humana***

Los anticuerpos monoclonales (mAb) son aquellas inmunoglobulinas producidas clones obtenidos por fusión de células B y líneas de células tumorales (hibridomas). Las inmunoglobulinas producidas por células B circulantes en sangre constituyen una mezcla de inmunoglobulinas cada una de las cuales reconoce un determinado antígeno, en cambio las producidas por hibridomas poseen especificidad por un antígeno, en particular una región del mismo conocida como epítotope. Por su especificidad los mAbs son un agente terapéutico adecuado para muchas enfermedades y su desarrollo ha ido creciendo desde que la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) en 1986 aprobó el primer mAb para evitar el rechazo del trasplante de riñón (Colvin y Preffer, 1991). Los mAbs, desde entonces, son empleados en terapia para el tratamiento de diversas enfermedades formando la familia de fármacos denominados mAbs terapéuticos. Debido a la especificidad de unión que poseen los anticuerpos, son empleados en la localización y eliminación de patógenos infecciosos. También se utilizan como terapia en la detección de células concretas del organismo como por ejemplo células tumorales, incluso en la inhibición de procesos inflamatorios. El primer anticuerpo monoclonal

terapéutico comercial producido era de origen murino producido mediante la técnica del hibridoma (Köhler y Milstein, 1975). Estos anticuerpos murinos comenzaron a ser extensamente utilizados en investigación y desarrollo (Hill, 1990); sin embargo, su uso clínico presenta importantes limitaciones derivadas de su origen no humano como por ejemplo una corta vida media en sangre, un ineficiente reclutamiento de células y moléculas requeridas para las funciones efectoras y problemas inmunológicos. En una proporción importante de los pacientes tratados con mAb murinos se desarrolla una respuesta de anticuerpos humanos anti-inmunoglobulinas murinas (HAMA, del inglés *Human Anti-Murine Antibodies*), provocando en algunos casos la pérdida de eficacia y en otros dicha reacción inmune generalizada. La manipulación genética de anticuerpos monoclonales murinos con la finalidad de reducir su inmunogenicidad comenzó en los años 80, dando lugar a los anticuerpos quiméricos ratón-humano (Morrison y col., 1984) y a los anticuerpos humanizados que poseen los CDRs de ratón y el resto humano (Riechmann y col., 1988). Estos anticuerpos modificados presentan una inmunogenicidad significativamente menor a la de los anticuerpos murinos, además de un mayor tiempo de vida medio en sangre. Unos años más tarde, fueron desarrollados ratones transgénicos modificados genéticamente de manera que produzcan anticuerpos humanos (Chadd y Chamow, 2001; Green y col., 1994), superándose la limitación que tiene el humanizar anticuerpos ya que muchas veces al combinar los CDRs de ratón con FR humanos se perdía la especificidad. La figura (3) presenta un esquema cronológico de la evolución de las tecnologías de producción de anticuerpos recombinantes (Lonberg, 2005). El efecto terapéutico de los anticuerpos monoclonales se debe, por un lado, a sus propiedades naturales como elementos efectores de la respuesta inmune, que incluyen la activación de células y por otro lado, pueden tener efectos derivados de la naturaleza de la diana. En este segundo caso, pueden desarrollar su actividad terapéutica bloqueando la actividad de moléculas. El bloqueo de la actividad de citoquinas o factores de crecimiento es llevado a cabo mediante la unión específica de los anticuerpos a dichos factores o a sus receptores en la superficie de las células. Además, los anticuerpos pueden emplearse como transportadores de fármacos, toxinas, enzimas o bien átomos radiactivos con el fin de dirigir estas moléculas terapéuticas exclusivamente al tipo celular deseado disminuyendo así el riesgo de toxicidad sistémica (Brekke y Sandie, 2003).

Los anticuerpos monoclonales aprobados hasta la fecha tienen aplicaciones

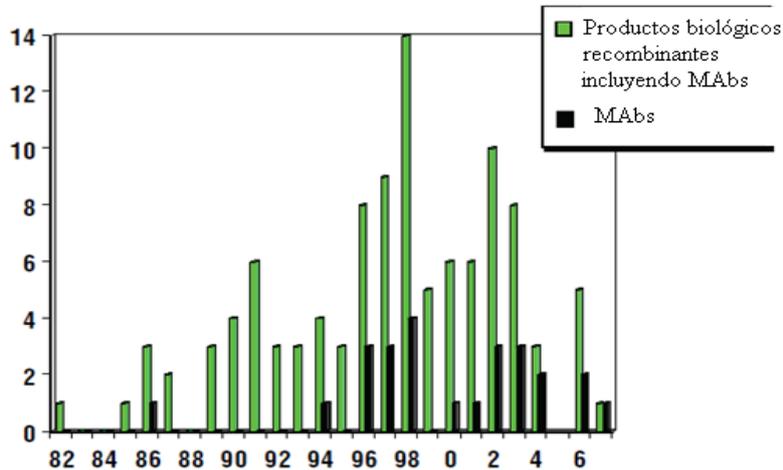
terapéuticas en áreas tan diversas como el cáncer, las enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas y el tratamiento del rechazo en los trasplantes. De todas ellas el cáncer es la enfermedad para la que se encuentran disponibles comercialmente un mayor número de anticuerpos monoclonales terapéuticos, existiendo también un gran número de mAbs en desarrollo para tratar enfermedades virales, en particular HIV (Reichert, 2003; Reichert, 2007).



**Figura (1.3)** Evolución en la tecnología de los anticuerpos terapéuticos. En general, los MAb aprobados por la FDA emergieron entre 10 y 12 años posteriores a las publicaciones científicas en las que se basan. Adaptado de *Lonberg, 2005*

**1.4. Los sistemas de producción de anticuerpos terapéuticos a nivel comercial**

Los anticuerpos monoclonales son actualmente las moléculas dominantes del mercado biofarmacéutico, representando aproximadamente el 20% de todos los productos biológicos (Figura 4; (Jones y col., 2007)). Avances en la ingeniería de mAb,



**Figura (1.4)** *Productos biológicos recombinantes y anticuerpos monoclonales aprobados por año.* El número total productos, incluyendo Mabs, desde 1982 se muestra en verde. Los Mabs aprobados se muestra en negro. No fueron incluidos derivados de anticuerpos que no contengan la porción de reconocimiento del anticuerpo. Sin embargo, estos productos fueron incluidos en el total. Fuente: *Jones y col., 2007.*

como las técnicas de injertos (Morrison y col., 1984; Riechmann y col., 1988) utilizadas para la construcción de anticuerpos humanizados y los ratones transgénicos que permitieron obtener mAbs humanos (Chadd y Chamow, 2001); los cuales han tenido un fuerte impacto en el tipo de anticuerpo monoclonal candidato a ingresar a pruebas clínicas (Figura 5; Reichert, 2008), siendo los anticuerpos humanizados y principalmente humanos recombinantes preferidos sobre el resto. Desde 1985, varias firmas comerciales han iniciado estudios clínicos de un total de 28 anticuerpos monoclonales (Reichert, 2008). En la actualidad más de 25 anticuerpos monoclonales están siendo utilizados como terapéuticos en todo el mundo. La comercialización de anticuerpos monoclonales, con ganancias de aproximadamente \$ 41 billones en 2010, continúa siendo una de las áreas más exitosas y prometedoras en el mundo del mercado farmacéutico (<http://www.visiongain.com/Conference/265/6th-Annual-Monoclonal-Antibodies>). Los anticuerpos monoclonales se han convertido en las drogas biotecnológicas de mayor éxito en la historia, en algunos casos formando parte integral de tratamientos estándar como:

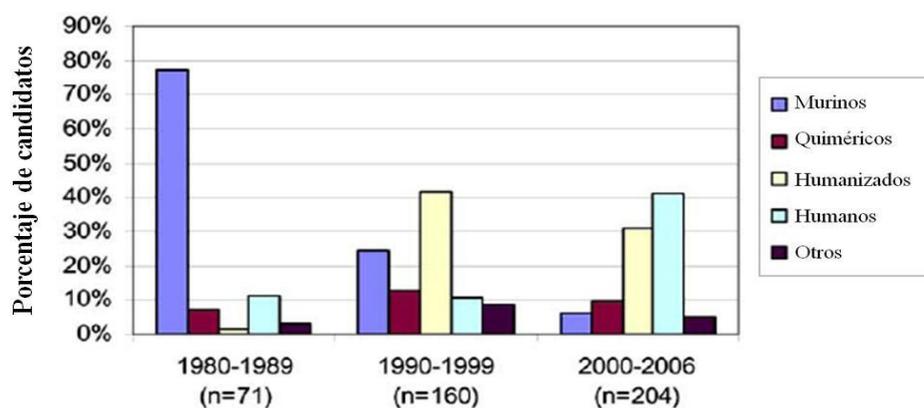
- **Herceptina** (trastuzumab): mAb humanizado que reconoce el factor 2 de crecimiento epidérmico humano (HER2) que se encuentra sobreexpresado en células tumorales en pacientes con cáncer de mama, (<http://www.herceptin.com/her2-breast-cancer/>),

- **Remicade** (Infliximab): mAb quimérico específico de TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor  $\alpha$* ) se emplea para distintos desórdenes inmunológicos como psoriasis, artritis reumatoide (AR), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y la espondilitis anquilosante (<http://www.remicade.com/remicade/global/index.html>),

- **Avastina** (Bevacizumab): mAb humanizado que reconoce el VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) y se utiliza para cánceres de colon y para degeneración macular, etc.

- **Humira** (Adalimumab): mAb humano específico de TNF- $\alpha$  con las mismas aplicaciones que el Remicade.

- **Rituxan** (Rituximab), mAb quimérico que reconoce CD20 empleado para tratar leucemias linfocitarias crónicas y linfomas de células B no Hodgking. Este anticuerpo, denominado primatizado, contiene dominios variables de macaco y dominios constantes humanos (Newman y col., 1992).



**Figura (1.5).** Anticuerpos monoclonales de distintas fuentes candidatos a pruebas clínicas en tres períodos. La categoría “Otros” incluye mAbs de rata, primates y biespecíficos. Se desconoce el tipo del 2% y 7% de los anticuerpos que ingresaron a pruebas clínicas en los períodos 1990-1999 y 2000-2006 respectivamente. Fuente: *Reichert, 2008*.

Los anticuerpos monoclonales recombinantes están siendo producidos para su utilización en el tratamiento de enfermedades, principalmente enfermedades autoinmunes y cáncer. Todos los anticuerpos monoclonales disponibles en el mercado

son producidos en células de mamíferos; debido fundamentalmente a que deben estar glicosilados adecuadamente. La glicosilación correcta de las inmunoglobulinas terapéuticas es sumamente importante para desencadenar algunas de sus funciones efectoras así como también porque determinan su tiempo de vida medio en sangre.

TABLA 1.1: Tipos celulares utilizados como huéspedes para la producción de anticuerpos monoclonales comerciales.

Línea celular	Especie	Número de productos
Hidridoma	Murino	5
SP2/0 mieloma	Murino	5
NSO mieloma	Murino	3
Otros mielomas	Murino	1
CHO ( <i>Chinese hamster ovary</i> )	Murino	10
EBV-Célula B transformada	Humano	1
<i>E. coli</i>	Microbiana	1

Adaptado de *Jones y col., 2007*

Por su glicosilación compleja la mayoría de los anticuerpos terapéuticos comerciales disponibles son producidos en líneas celulares de mamíferos (Tabla 1). Sin embargo la glicosilación de estos sistemas, además de diferir de la humana, es heterogénea y varía de una partida a otras lo que genera inconvenientes al momento de determinar dosis efectivas y bioequivalencias (Jefferis, 2005). Debido al prometedor futuro del mercado de los anticuerpos monoclonales y las grandes cantidades de anticuerpo que requiere la inmunoterapia por paciente por año, las compañías farmacéuticas están centrando su interés en sistemas que permitan obtener elevados niveles de producción. Únicamente los animales transgénicos y las plantas transgénicas son capaces de dar lugar a un producto funcional con niveles de producción tan elevados.

## ***2. Las plantas como sistema de producción de proteínas heterólogas***

Los avances en ingeniería genética de las últimas décadas hicieron posible la producción de proteínas terapéuticas en bacterias, levaduras y células animales, moléculas que hasta entonces solo era posible obtener mediante procesos de extracción a partir de fuentes animales o cadáveres. La creciente demanda de la industria farmacéutica de contar con sistemas de expresión heterólogos cada vez más eficientes y económicos ha provocado que se focalicen esfuerzos en optimizar los sistemas disponibles y en la búsqueda de sistemas de expresión de alta capacidad, donde las plantas transgénicas son la opción más prometedora.

Las proteínas de uso farmacéutico se encuentran sometidas a estándares de producción muy rigurosos y esto se debe a que muchas de ellas deben ser administradas directamente al torrente sanguíneo. Para satisfacer estos estándares de producción el procesamiento *downstream* se vuelve extremadamente costoso, ya que varias etapas de purificación son requeridas. Por lo tanto, se necesitan sistemas de producción a gran escala que permitan obtener altos niveles de proteína recombinante, de calidad reproducible y por el menor costo posible. El sistema de producción debe ser capaz de generar un producto funcional, esto es, con las propiedades bioquímicas y farmacocinéticas adecuadas para que pueda llevar a cabo su función terapéutica. Para esto, deberá poder llevar a cabo todas las modificaciones co- y post-traduccionales requeridas por la proteína terapéutica de interés, incluyendo clivaje del péptido señal, procesamiento de pro-péptido, plegado correcto de la proteína, formación de puentes disulfuro y glicosilación (Gomord y Faye, 2004). Como se ha mencionado previamente, el desarrollo de métodos de alta capacidad para la producción de proteínas recombinantes es crítico tanto por la creciente demanda de este tipo de productos como por la necesidad de reducir los costos de producción. Entre los sistemas de alta capacidad se encuentran las plantas y animales transgénicos (Abranches y col., 2005; Stoger y col., 2005; Ripoll y Houdebine, 2006).

### ***2.1. Ventajas y desventajas con respecto a otros sistemas de producción***

Las plantas han emergido como una alternativa adecuada a los sistemas actuales de producción de proteínas terapéuticas y, hoy en día, su capacidad de producir proteínas de mamíferos biológicamente activas con bajos costos de producción, mayor seguridad y alta calidad, está bien documentada (Gomord y col., 2004; Walsh y Jefferis, 2006); Twyman y col., 2003; Gomord y Faye, 2004). Poseen numerosas ventajas entre las que destacan: transformación génica más sencilla que la de grandes animales; mayor seguridad; su capacidad tolerar proteínas que pueden resultar tóxicas para mamíferos y fácil escalado (Petruccelli y col., 2006). La capacidad de las plantas de expresar genes humanos fue establecida en 1986, cuando se mostró que callos de tabaco eran capaces de producir transcritos de un gen de fusión conformado por el gen de la hormona de crecimiento humana y el gen de nopalina sintetasa de *A. tumefaciens* (Barta y col., 1986). Posteriormente se mostró que las células vegetales podían ensamblar correctamente anticuerpos (Hiatt y col., 1989), incluso inmunoglobulinas Ig A secretorias que resultan de la combinación de los productos de 4 genes (Ma y col., 1995) y que producen un efecto protector por inmunización pasiva (Wycoff, 2005). También, la albúmina sérica humana fue producida en hojas y en suspensiones celulares de tabaco y papa (Sijmons y col., 1990). Desde entonces, muchas proteínas terapéuticas fueron producidas en plantas, incluyendo inmunoglobulinas de distinto tipo, proteínas séricas, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, enzimas recombinantes y antígenos y epitopes para ser empleados en vacunas recombinantes para uso humano y veterinario (Twyman y col., 2005). Las plantas son probablemente el mejor sistema de producción desde el punto de vista económico, ya que tanto las inversiones de capital y costos necesarios son significativamente inferiores que para los sistemas basados en células de mamíferos; y ha sido estimado que las proteínas recombinantes pueden ser producidas en plantas con costos del 2 al 10 % de los correspondientes a sistemas de fermentación microbiana y a un 0.1% del costo de las líneas celulares de mamíferos, dependiendo de los rendimientos alcanzados (Giddings, 2001). Además de las ventajas que presenta desde el punto de vista económico, las plantas transgénicas constituyen un sistema de producción seguro ya que no se conocen patógenos de plantas que puedan afectar a los humanos. En contraste, la potencial presencia de virus, priones y otros componentes indeseables en células de mamíferos es una preocupación siempre

presente, que eleva significativamente los costos de procesamiento y purificación.

Así, un gran número de proteínas de interés para terapia, prevención (profilaxis), diagnóstico o con aplicaciones industriales se producen en distintos tipos de vegetales, generalmente en hojas (ej; Ma y col., 2005) o en tejidos de almacenamiento de cereales y en raíces (Menkhaus y col., 2004; Stoger y col., 2005), algunas de las cuales se comercializan recientemente (Tabla 2) y, otras tantas se encuentran en etapas avanzadas de pruebas o preclínicas (Tabla 3).

TABLA 1.2: Proteínas recombinantes de interés comercial producidas en plantas.

Producto	Compañía	Planta	Nombre comercial	Nº Catalogo/URL
<b>Avidina</b>	Prodigene	Maíz	Avidin	#A8703, Sigma-Aldrich
<b>B-Glucuronidasa</b>	Prodigene	Maíz	GUS	#G2035, Sigma-Aldrich
<b>Tripsina</b>	Prodigene	Maíz	TrypZean™	#T3568, Sigma-Aldrich
<b>Lactoferrina Humana Recombinante</b>	Maristem Therapeutics/ Ventria Bioscience	Maíz/ Arroz	Lacromin™	#L4040, Sigma-Aldrich
<b>Lisozima Humana Recombinante</b>	Ventria Bioscience	Arroz	Lysobac™	#L1667, Sigma-Aldrich
<b>Aprotonina</b>	Prodigene	Maíz/ Tabaco transgénico	AproliZean	#A6103, Sigma-Aldrich
<b>Lipasa Recombinante</b>	Meristem Therapeutics	Maíz	Merispace®	<a href="http://www.meristem-therapeutics.com/">http://www.meristem-therapeutics.com/</a>

Adaptado de *Sharma y col., 2009*.

Las limitaciones que actualmente presentan las plantas como biorreactores incluyen, bajos rendimientos (muchas veces debido a la baja estabilidad de la proteína recombinante), dificultades con el procesamiento *downstream* (dando lugar a una calidad inconsistente en el producto), y la presencia de estructuras de glicanos diferentes a las humanas en las proteínas recombinantes. De entre estos problemas, sin duda la mayor desventaja es que todavía los niveles de expresión son muy bajos para que la producción resulte rentable (Ma y col., 2005; Stoger y col., 2005; Petruccielli y col., 2006). Estos problemas plantean cuestiones de reglamentación y han impedido la aprobación de productos biofarmacéuticos derivados de plantas en ensayos clínicos (Stein y Webber, 2001; Miele, 1997).

TABLA 1.3: Proteínas recombinantes de interés comercial producidas en distintos sistemas vegetales y que se encuentran en etapas avanzadas de pruebas o etapas preclínicas.

Producto	Planta Sistema	Indicaciones	Compañía/Referencia
Glicoproteína S	Arabidopsis/ Hoja	Vacuna Gastroenteritis transmisible (TGE)	Gomez y col., 1998
Glicoproteína S	Papa/ Tubérculo	TGE	Gomez y col., 2000
Glicoproteína S	Tobaco/ Hoja	TGE	Tuboly y col., 2000
Proteína estructural VP60	Papa/ Hojas y tubérculo	Vacuna Síndrome hemorrágico de conejo (RHDV)	Castañón y col., 1999
Proteína estructural VP60	Papa/ Hojas y tubérculo	Vacuna (RHDV)	Castañón y col., 2002
Proteína estructural VP60	Papa/ tubérculo	Vacuna (RHDV)	Martin-Alonso y col., 2003
Antígeno A (proteína de superficie)	Tabaco/ Hojas	Anti-Streptococcus mutans	Curtiss and Cardineau, 1990
Glicoproteína de VSVG	Tabaco/ Hojas	Vacuna Virus de Estomatitis Vesicular (VSVG)	Galbrain y col., 1992
Glicoproteína B	Tabaco/ Semilla	Vacuna Citomegalovirus Humano (HCMV)	Tackaberry y col., 1999
Proteína de cápside VPZ	Arabidopsis/ Hoja	Vacuna Parvovirus canino	Gil y col., 2001
SeroAlbúmina Bovina (HSA)	Tabaco	Uso no clínico	Chlorogen Inc.
Interferon $\alpha$ 2b	Lemma	Hepatitis B, C, Cáncer hepático	Biolex Inc.
Leucotoxina (Lkt)	Trebol blanco/ Hojas	Vacuna Mannheimia haemolytica (diarrea viral bovina)	Lee y col., 2001
Antígeno Tetánico	Tabaco/ cloroplastos	Vacuna anti-Clostridium tetanis	Tregoning y col., 2001
Anticuerpo –Caries (CaroX™)	Tabaco	Prevención de caries	Planet Biotechnology Inc.
Colágeno	Alfalfa	Uso no clínico	Medicago Inc.
Colágeno	Tabaco	Uso no clínico	Meristem Therapeutics Inc.
Proteína de cubierta B5 Vaccinia	Tabaco/ Hojas	Vacuna contra la Viruela (virus Vaccinia)	Golovkin y col., 2007
Proteína de anclaje HVI-1	Tomate/ Fruto	Tratamiento/ Vacuna HIV/SIDA	Ramirez y col.,
$\beta$ -amiloide humano	Papa/ Tubérculo	Tratamiento/ Vacuna Alzheimer's	Kim y col., 2003
$\beta$ -amiloide humano	Tomate/ Fruto	Tratamiento/ Vacuna Alzheimer's	Youma y col., 2008
H5/HA1 variable HDEL	Tabaco/ Hojas	Antígeno Gripe Aviar Influenza tipo H5/HA1	Spitsin y col., 2009
Proteína de fusión F1-V	Tomate/ Fruto	Vacuna Peste Bubónica/ Neumoniasis (Yersinia pestis)	Alvares y col., 2006
Proteína de fusión F1-V	Tabaco/ cloroplastos	Vacuna Peste Bubónica/ Neumoniasis (Yersinia pestis)	Arlen y col., 2008
Proteína de cápside HPV11	Células d tabaco NT1	Vacuna Cáncer Cervical Virus Papiloma Humano (HPV)	Warzecha y col., 2003
scFV-HER2	Tabaco/ Hojas	Cáncer de pulmón (Receptor-2 factor de crecimiento)	Galeffi y col., 2005
Epitope HPV16	Tabaco/ Hojas	Vacuna Cáncer Cervical HPV	Hoffmeisterova y col., 2008
Proteína estructural VP1	Tabaco/ Hojas	Vacuna Virus Fiebre Aftosa	Wigdorovitz y col., 1999
Proteína estructural VP1	Alfalfa/Hojas	Vacuna Virus Fiebre Aftosa	Wigdorovitz y col., 1999
Proteína estructural VP1	Quinoa/Tabaco	Vacuna Virus Fiebre Aftosa	Yang y col., 2007
Antígeno de superficie HBsAg	Tabaco/ Hojas	Vacuna Hepatitis B	Mason y col., 1992
Antígeno de superficie HBsAg/M	Tabaco/ Hojas	Vacuna Hepatitis B	Huang y col., 2005
Antígeno de superficie HBsAg	Tabaco/ Fruto	Vacuna Hepatitis B	Srinivas y col., 2008
Proteína de anclaje HIV-1	Espinaca/ Hojas	Vacuna HIV-1	Karasev y col., 2005
Proteína transmembrana gp41	Arvejas/Hojas	Tratamiento HIV y lesiones neurológicas	Durrani y col., 1998
Subunidad B toxina (CTB)	Tabaco/ Hojas	Vacuna Cólera	Hein y col., 1996
CTB	Papa/ Hojas y tubérculo	Vacuna Cólera	Arakawa y col., 1997
CTB-INS (insulina)	Papa/ Hojas y tubérculo	Tratamiento Cólera y Diabetes	Arakawa y col., 1998

Adaptado de *Tiwari, 2009*

A pesar de los bajos niveles de escala de producción, obteniéndose hasta 10 kg por hectárea considerando cultivos como: tabaco, maíz, soja o alfalfa (Khouidi y col., 1999), hacen que la producción de proteínas recombinantes en plantas sea muy prometedora.

## ***2.2. Secuencias regulatorias empleadas al expresar genes en plantas y sus efectos en los niveles de acumulación.***

### ***2.2.1. Secuencias que determinan la eficiencia de los procesos de transcripción y/o traducción.***

La eficiencia del proceso de transcripción depende de la secuencia promotora, de la presencia de *enhancers*, de la secuencia de terminación de la transcripción y otros elementos regulatorios que determinan el estado de la cromatina. En general, se utilizan diferentes promotores, los cuales se clasifican por el tipo de actividad; a manera de ejemplo podemos citar entonces: promotores constitutivos fuertes, que inducen la expresión de genes en una forma menos dependiente de factores espaciales, del entorno o de desarrollo y se utilizan generalmente para la producción de proteínas recombinante en todos los tejidos de la planta. Uno de los más extensamente utilizados, y con el que se ha alcanzado altos niveles de expresión y acumulación, es el promotor 35S del virus de mosaico del coliflor (35S CaMV, *Cauliflower Mosaic Virus*). La producción de varias proteínas antigénicas como el antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg), la glicoproteína G del virus de la rabia o, productos de importancia industrial como avidina y adiponectina, son algunos ejemplos en los que se ha utilizado este promotor. Asimismo, podemos mencionar el promotor de la ubiquitina, ampliamente utilizado para expresar eficientemente en monocotiledóneas (maíz, trigo, arroz, entre otros), siendo sus niveles de expresión en hojas y semillas comparables con el 35S CaMV, incluso cuando la proteína recombinante no es detectada al utilizarse el promotor 35S CaMV en semilla. Por otro lado, encontramos promotores inducibles, donde la actividad del mismo puede ser modulada a veces, por componentes químicos endógenos o exógenos y otras, regulada por factores del medio o del desarrollo como la sequía, estrés salino, luz, temperatura, etc. En general, utilizados cuando la expresión del transgen interfiere con el desarrollo o crecimiento normal de la planta y especialmente en los casos en que la producción de la biomolécula es letal para la planta. Entre varios

ejemplos, podemos citar el promotor inducible de alfa-amilasa de arroz ( $\alpha$ Amy3), utilizado para la expresión de  $\alpha$ 1-antitripsina (Terashima y col., 1999) o, del interferón gamma humano (Chen y col., 2004). Otro tipo de promotores utilizados son los promotores tejido específicos, que controlan la expresión de manera específica en un tejido o estado de desarrollo. Estos son muy utilizados para concentrar la proteína recombinante en ciertos órganos, como semillas o frutos, disminuyendo los posibles efectos negativos en el crecimiento y desarrollo del resto de la planta y facilitando además, en algunos casos, la eficiencia de cosecha. Una estrategia que ha arrojado buenos resultados es la utilización de factores de cis- o trans-activación (*cis- o trans-acting factors*), los cuales se unen directamente al promotor para dirigir la expresión o, interactúan con otros factores reclutándolos para unirse al promotor (Beachy y col., 2007), permitiendo aumentar la expresión de genes reporteros (Yang y col., 2001).

Otro punto muy importante, para mejorar la eficiencia y la fidelidad de la traducción de los sistemas de expresión en plantas, es modificar los codones del gen de interés para adecuarlo al uso de codones de la especie vegetal empleada, también incluir la secuencia de Kozak para favorecer el inicio de la traducción, evitar que la secuencia del mRNA que se genere tenga intrones crípticos, secuencias ricas AT (que provocan el “resbalado” de los ribosomas) o que tengan tendencia a adquirir estructura secundaria. En la mayoría de los eucariotas, para el inicio de la transcripción son muy importantes las regiones 5' sin traducir (5'UTR, 5' *untranslated region*), y la región 3' sin traducir (3'UTR, 3' *untranslated regions*) ya que contienen la información necesaria para la poliadenilación, que también determina la estabilidad del mRNA, pues el mismo debe pasar los mecanismos de control de calidad (Chan y Yu, 1998). Uno de los factores a tener en cuenta en la expresión del gen de interés, son los efectos de posición, el número de copias de transgen integradas y el posible silenciamiento (Bhat and Srinivasan, 2002; Butaye y col., 2004; Fischer y col., 2008). Por ello, muchas estrategias han desarrollado vectores o cassettes de expresión pensados para lograr niveles de expresión uniformes independientemente del sitio de integración. Entre tantas, podemos citar las MAR's (*Matrix Attachment Regions*), que también engloban las secuencias regulatorias, por ejemplo estos elementos ricos en bases nucleotídicas AT que reducen los efectos de posición por la formación de *loops*, haciendo que el transgen quede en una zona en que la cromatina es activa, incluso en las generaciones subsiguientes (Vain y col., 1999). El uso de MARs en plantas no siempre ha mejorado los niveles de acumulación de la

proteína de interés, sin embargo actualmente se están empleando estrategias computacionales y ómicas para identificar secuencias que puedan producir este efecto de evitar la formación de heterocromatina alrededor del transgen (Levin y col., 2005; Oh y col., 2005; Shirai and Fukuda, 2006; Tetko y col., 2006; Verma y col., 2005).

### ***2.2.2. Procesamiento co y post-traduccional y su importancia en la obtención de productos con actividad biológica***

Durante la síntesis de la proteína así como también una vez completada la traducción, se llevan a cabo varias modificaciones cuya eficiencia puede variar pues depende de la presencia de proteínas auxiliares y de la maquinaria que transporta a la proteína a su destino final. El plegamiento de proteínas con varios dominios suele requerir de la asistencia de chaperonas, muchas de ellas específicas de ciertas familias (De Marco, 2009; Houston y col., 2005; Huo y col., 2007; Krishna and Gloor, 2001). El clivaje proteolítico del péptido señal y también el paso de la proproteína a proteína por acción de endopeptidasas, también es importante para el plegamiento correcto. Además, se producen modificaciones por introducción de nuevos grupos funcionales por la acción de enzimas como por ejemplo: glicosilación, fosforilación, metilación, ADP-ribosilación, oxidación, acilación, isoprenilación, y también modificaciones no enzimáticas como deaminaciones, racemizaciones, etc. (Faye y Gomord, 2009), cada una de ellas cumple un papel de menor o mayor importancia determinando la estructura y la actividad de la proteína de interés. En células vegetales como en líneas celulares de mamíferos se ha recurrido a la glicoingeniería introduciendo las enzimas faltantes en la célula hospedadora o bien silenciando enzimas que producen glicanos inmunogénicos. Entre las varias estrategias para evitar la adición de glicanos inmunogénicos se puede mencionar la retención en retículo endoplásmico (ER, *endoplasmic reticulum*), la inhibición de glicosiltransferasas del aparato de Golgi (GA, *Golgi apparatus*) específicas de plantas y, una estrategia interesante, últimamente desarrollada, como la “humanización” de plantas por expresión heteróloga de glicosiltransferasas de mamíferos (Bakker y col., 2006; Zeleny y col., 2006; Saint-Jore-Dupas y col., 2007).

### 2.3. Formatos que pueden emplearse para la síntesis de proteínas en plantas

#### 2.3.1. Planta entera: sistemas de expresión estable y transitoria

La mayoría de las proteínas farmacéuticas derivadas de plantas han sido producidas por transformación nuclear estable, generando líneas transgénicas a partir de tejidos transgénico. Los protocolos de producción de líneas de plantas transgénicas poseen la desventaja de demandar gran cantidad de tiempo, por este motivo otras tecnologías están siendo investigadas. La expresión transitoria es generalmente utilizada para verificar la funcionalidad de una construcción y validar pequeñas cantidades de proteína recombinantes. Este tipo de expresión puede llevarse a cabo mediante la infiltración de hojas con suspensiones de *A. tumefaciens* recombinante, resultando en la transformación transitoria de muchas células (Kapila y col., 1997). De esta manera, altos niveles de proteína recombinante pueden ser alcanzados por un corto período de tiempo, pero esta técnica es generalmente insuficiente para la producción a gran escala (Vaquero y col., 2002; Kathuria y col., 2002). Avances recientes, sin embargo, describen como esta agroinfiltración podría ser escalada de manera más eficiente. Baulcombe y colaboradores (Voinnet y col., 2003), demostraron que la pérdida de la expresión luego de unos días se debe fundamentalmente al silenciamiento génico post-transcripcional. Mediante la co- expresión de la proteína p19 del virus de tomate (*bushy stunt virus*), un fuerte supresor de este tipo de mecanismo, obtuvieron un incremento mayor a 50 veces en la expresión de la proteína recombinante superior. La utilización de vectores virales para la expresión transitoria de proteínas heterólogos ofrece una herramienta importante para la producción a gran escala de proteínas de importancia farmacéutica como anticuerpos o vacunas. Este proceso, que requiere de *A. tumefaciens* como vector para transportar el DNA de uno o más replicones del RNA viral a las células de las plantas, ha mostrado buenos resultados para varias proteínas de interés (Gleba y col., 2007), un ejemplo lo constituye el sistema desarrollado por Bayer “**magnICON® technology**” con el cual es producida una vacuna para el tratamiento de NHL (*non-Hodking’s lymphoma*) que se encuentra actualmente en pruebas clínicas (<http://www.bayer.com/en/Bayer-Innovation-GmbH.aspx>).

### 2.3.2. Cultivo de células vegetales

El cultivo de células vegetales posee varias ventajas sobre las plantas transgénicas cultivadas en campo o en invernadero para la producción de proteínas recombinantes. Entre estas ventajas, podemos mencionar el hecho de que las células crecen *in vitro* en condiciones estériles y de alta contención, permitiendo producir bajo cGMP (*current Good Manufacturing Practice*) (Shadwick y Doran, 2005). Algunas células crecen rápido, como es el caso de las células de tabaco BY2 que poseen una velocidad de crecimiento particularmente alta cuyo tiempo de duplicación, en condiciones de óptimo crecimiento, es de 12 hs; permitiendo alcanzar rápidamente una importante biomasa (Hellwig y col., 2004). Este sistema de producción permite secretar de manera eficiente la proteína recombinante a un medio de cultivo simple, una importante ventaja en la posterior purificación. Es así que, si bien aumentan los costos por la utilización de fermentadores en lugar de plantas transgénicas este aumento es balanceado con la disminución de los costos de procesamiento *downstream*. Otra ventaja es que las células vegetales en cultivo son uniformes en tamaño y tipo, dando lugar a una baja heterogeneidad comparada con la producción en plantas enteras. Por ejemplo, fue informado que los patrones de glicosilación de un anticuerpo expresado en plantas de tabaco, variaba con el estado fisiológico de la hoja (Elbers y col., 2001). En contraste, los patrones correspondientes a cultivos de células BY2 de tabaco son reproducibles de partida en partida y la complementación del medio podría reducir marcadamente la heterogeneidad de los N-glicanos (Faye y Gomord, 2010; Gomord y col., 2010). Las suspensiones de células de tabaco son las más utilizadas, aunque también han sido producidas proteínas recombinantes en células de soja, tomate y arroz (Kwon y col., 2003; Shin y col., 2003; Smith y col., 2002). También empleando la planta acuática *Lemna minor* se han obtenido buenos rendimientos y una glicosilación homogénea (Cox y col., 2006). Muchas proteínas farmacéuticas han sido expresadas en cultivos de células vegetales, entre ellas podemos mencionar interleuquinas, eritropoyetina, anticuerpos y el antígeno de la hepatitis B (Shadwick y Doran, 2005). Desafortunadamente, solo unas pocas han sido expresadas con rendimientos suficientes para su producción a nivel comercial. En la actualidad, todavía no existen líneas celulares modificadas de forma de lograr una alta capacidad de producción, y este campo es de sumo interés por las grandes ventajas, previamente mencionadas, que este

sistema de expresión presenta.

#### ***2.4. La síntesis de anticuerpos empleando en plantas***

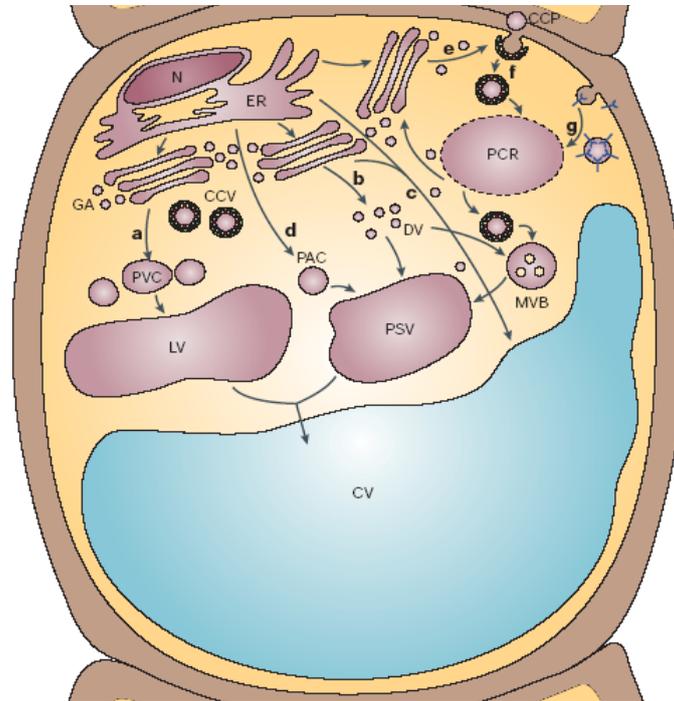
Como se describió anteriormente, los anticuerpos monoclonales son actualmente el grupo de biofarmacéuticos más importante y dado su creciente demanda existe la necesidad de desarrollar de sistemas de producción de alta capacidad de síntesis que puedan glicosilarlos adecuadamente. La capacidad de las plantas de plegar y ensamblar proteínas humanas complejas ha sido demostrada por la exitosa producción de anticuerpos funcionales aún de estructura tan compleja como las inmunoglobulinas de tipo A secretorias (Ma y col., 1995), las cuales poseen diez polipéptidos que provienen de cuatro genes: cuatro cadenas livianas, cuatro cadenas pesadas, una cadena de unión y una subunidad que constituye el componente secretorio (Ma y col., 1995; Larrick y col., 2001) y que en mamíferos sólo se producen con dos tipos celulares diferentes. Desde la producción del primer anticuerpo funcional en plantas (Hiatt y col., 1989), muchos otros anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, han sido producidos con fines terapéuticos o de diagnóstico en varios sistemas de expresión en plantas (Gomord y col., 2004). Los anticuerpos producidos en plantas se encuentran ensamblados correctamente, madurados proteolíticamente y glicosilados. Estos anticuerpos, también llamados “plantibodies”, poseen N-glicosilaciones tanto alta manosa como biantenarias complejas (Cabanes-Macheteau y col., 1999; Bakker y col., 2001). Los N-glicanos de alta manosa poseen la misma estructura en glicoproteínas de mamífero y de planta, pero los N-glicanos complejos son estructuralmente diferentes. A pesar de estas diferencias en las estructuras de los N-glicanos, los anticuerpos producidos en plantas poseen una capacidad de unión de antígeno similar a su homólogo producido en células de mamífero. Actualmente se están ensayando distintas estrategias de glicoingeniería en células vegetales de manera de lograr una glicosilación del Fc que permita a los plantibodies tener funciones efectoras similares a los producidos en líneas celulares de mamíferos y además tener una vida media en sangre más prolongada (Bakker y col., 2001; Lerouxel y col., 2005; Cox y col., 2006; Paccalet y col., 2007; Sourrouille y col., 2008).

### ***3. La síntesis de proteínas en la vía secretoria de células vegetales***

#### ***3.1. Características particulares de la vía secretoria de células vegetales***

En las células eucariotas, el sistema de membranas internas que delimitan distintos compartimientos dentro de la célula, excluyendo plástidos y mitocondrias, a menudo es denominado “sistema de endomembranas”. El mismo está compuesto por organelas específicas, las cuales están principalmente especializadas en la producción y maduración de macromoléculas, su almacenamiento, degradación y reciclado. En términos generales las organelas que constituyen el sistema de endomembranas son: el Retículo Endoplásmico (RE), el Aparato o Complejo de Golgi (AG), compartimientos prevacuolares (PVC), cuerpos multivesiculares, distintos tipos de vacuolas: líticas (LV), de reserva (PSV) y central (CV), vesículas transportadoras: vesículas cubiertas de clatrina (CCV), densas (DV), PAC, *precursor-accumulating compartment* (PAC) secretorias (VS), y la Membrana Plasmática (Figura 6) (Surpin y Raikhel, 2004). El RE comprende una red tridimensional de hojas y túbulos continuos que subyace a la membrana plasmática, distribuido en el citoplasma y en continuación a la envoltura nuclear. Si bien originalmente se distinguen tres tipos o subcompartimientos de ER: el rugoso, el liso y la envoltura nuclear; hoy en día se sugiere una clasificación basada en los distintos dominios metabólicos, morfológicos u otros criterios (Staehelein, 1997). En plantas, el AG está dividido en apilamientos individuales, siendo el más próximo al ER denominado cis-Golgi, seguido del Golgi-medio y el más alejado conocido como trans-Golgi; al final se encuentra un red compleja de cisternas la cual se la ha llamado Red del trans-Golgi (TGN, *trans golgi network*) y posee una movilidad mayor al AG de células animales (Ward y Brandizzi, 2004). Por otro lado, de manera más específica, en el sistema de endomembranas encontramos el Compartimiento Pre-Vacuolar (PVC, *prevacuolar compartment*) que está recibe las proteínas desde las vesículas secretorias y posteriormente las transporta a las vacuolas (Bethke y Jones, 2000). Finalmente, las vacuolas son el compartimiento clave en la célula vegetal, realizando muchas funciones vitales y esenciales para la planta, por ejemplo: mantienen la turgencia, homeostasis protoplasmática y, almacenan tanto metabolitos secundarios como proteínas que luego son degradadas para proveer carbono, nitrógeno y fuente de azufre tanto para el crecimiento como para el desarrollo de la planta (Marty, 1999). Las plantas presentan al menos dos tipos de vacuolas funcionalmente distintas: vacuolas líticas, halladas

mayormente en células vegetativas y, vacuolas de reserva (PSV, *Protein Storage Vacuols*), descritas inicialmente en cotiledones y endosperma de semilla (Hoh y col.,



**Figura (1.6)** *El sistema de endomembranas de plantas.* Este sistema posee compartimentos y componentes de tráfico que son conservados para todos los eucariotas y algunos que son exclusivos de plantas. En el esquema se señalan las siguientes rutas: a) Ruta del propéptido amino-terminal (NTPP); b) Ruta del propéptido carboxi-terminal (CTPP); c) Vía ER-Vacuola; d) ER-PAC-Vacuola; e) Ruta de secreción; f) Endocitosis CCV; g) Endocitosis mediada por receptor. CCP, hoyos cubiertos de clatrina; CCV, vesículas recubiertas de clatrina; CV, vacuola central; DV, vesículas densas; ER, retículo endoplasmático; GA, aparato de Golgi; LV, vacuola lítica; N, núcleo; PAC, precursor de compartimento de acumulación; PB, cuerpo proteico; PCR, retículo parcialmente recubierto; PSV, vacuola de almacenamiento proteico; PVC, compartimiento pre-vacuolar; SV, vesícula secretoria.

1995; Paris y col., 1996; Vitale y Raikhel, 1999; Herman y Larkins, 1999). Las proteínas dirigidas al sistema de endomembranas contienen una secuencia N-terminal llamado péptido señal (SP, *Signal Peptide*). Al iniciarse la traducción del mRNA, todas las proteínas nacientes se unen a ribosomas citosólicos libres; no obstante, aquellas que serán incorporadas en la vía secretoria, el SP interacciona con la partícula de reconocimiento de señal (SRP, *signal recognition particle*) y suspende o retarda la traducción hasta que el complejo ribosoma-mRNA-proteína naciente-SRP se une a un complejo en la membrana del ER, dirigiendo la proteína en síntesis hacia el lumen de este. Una vez que se establecieron estas interacciones, el SRP se suelta y el ribosoma reanuda la traducción (Walter y Blobel, 1981). La secuencia SP es clivada ni bien ingresa al lumen del ER, esta remoción es esencial para el correcto plegado del dominio

N-terminal de la nueva proteína. Los pasos siguientes son una cascada de interacciones entre la proteína en proceso de síntesis y las chaperonas que se encuentran en el lumen del ER que, no sólo estabilizan la estructura nativa de la proteína, sino también facilitan la formación de uniones disulfuro, incorporación de glicanos, etc. (Ulrich Hartl y Martin, 1995; Fink, 1999). Una vez completada la síntesis de la proteína, esta suele interactuar con receptores de la membrana y, en el sitio de interacción, se desencadena la formación de las vesículas COP II que realizan el transporte anterógrado (hacia adelante) en la vía secretoria, transportando la proteína recién sintetizada desde el ER al AG (Figura 7). Las proteínas que no han alcanzado la estructura nativa y las proteínas residentes del ER, como las chaperonas, que suelen ser transportadas al AG, son recuperadas al ER por medio de vesículas COP I en lo que se conoce como transporte retrógrado (hacia atrás). Sin embargo, si la proteína recién sintetizada no logra adquirir la estructura tridimensional correcta, permanece unida a BiP (*immunoglobulin binding protein*), una chaperona de la familia HSP (*heat shock proteins*) y se activa la respuesta UPR (*unfolded protein response*) por la cual, la proteína es exportada fuera del ER para ser degradada por el proteosoma. Los componentes que reconocen la secuencia SP, chaperonas y componentes de la respuesta UPR, están altamente conservados en eucariotas (Alberts y col., 2008). La proteína recién sintetizada sigue su camino a través del AG y, la ausencia de otras señales de direccionamiento hace que sea secretada, camino conocido como *default pathway* (Denecke y col., 1990).

### ***3.2. Estrategias que pueden emplearse en el estudio de la vía secretoria***

Los primeros estudios de la actualmente denominada vía secretoria, se realizaron por microscopía electrónica ya sea para ver ultraestructura o bien analizar localización de determinadas proteínas. La ruta y destino final de proteínas sintetizadas en esta vía fueron estudiadas por experimentos de pulso y lavado seguido de autorradiografías lo que permitió empezar a comprender su funcionamiento. En la actualidad se cuenta con herramientas que permiten visualizar una proteína de interés, y diferenciar los distintos componentes subcelulares, *in vivo* empleando nuevas tecnologías como por ejemplo microscopía confocal y multifotónica junto con proteínas fluorescentes de distintos colores utilizadas como marcadores. Entre las aplicaciones de estas nuevas tecnologías

se pueden mencionar:

- ✓ Identificación de señales de direccionamiento presentes en proteínas de interés.
- ✓ Estudio de las distintas organelas u otros componentes celulares in vivo, lo que permite evaluar el dinamismo de la vía.
- ✓ Estudios de colocalización de moléculas de interés.
- ✓ Estudio de interacciones moleculares por FRET (“*fluorescence resonance energy transfer*”).
- ✓ Estudio del tráfico intracelular por FRAP (“*fluorescence recovery after photobleaching*”).
- ✓ Estudio de la estructura tridimensional de la célula a través de la reconstrucción de micrografías tomadas en distintos planos.

La primera proteína fluorescente utilizada como marcador en este tipo de estudio fue la verde (GFP) cuyo gen fue obtenido de medusas. El gen codificante para esta proteína no se expresaba bien en células vegetales hasta que se obtuvieron variantes, mGFP4 y mGFP5 (Siemering y col., 1996; Haseloff y Amos, 1995) lo que constituyó el inicio de los estudios de biología celular empleando este tipo de metodología en plantas. Posteriormente, el desarrollo de proteínas fluorescentes cubriendo prácticamente todo el espectro visible ha permitido a los investigadores visualizar múltiples proteínas simultáneamente y estudiar localización, dinámica e interacciones (Hanton y Brandizzi, 2006; Matheson y col., 2006). Entre las variantes derivadas de la proteína salvaje GFP (wt-GFP, *wild tipe* GFP) por mutaciones puntuales, podemos mencionar EGFP (*enhanced GFP*), CFP, ECFP (*enhanced CFP*), EYFP (*enhanced YFP*). En cuanto a las proteínas rojas, DsRed fue clonada a partir de *Discosoma sp.*, para su utilización como proteína reportera hace más de una década (Matz y col., 1999). Desafortunadamente, esta proteína naturalmente se ensambla formando tetrámeros lo que impide que sea utilizada para experimentos de localización dado a problemas de direccionamiento y agregación. Mediante evolución dirigida de proteínas se obtuvo un repertorio de proteínas fluorescentes monoméricas y diméricas con características de interés como: mayor brillantez, fotoestabilidad, tolerancia a fusiones N- y C-terminales y a pHs

ácidos, (Shaner y col., 2004). Entre las proteínas fluorescentes (PFs) rojas, mCherry y tDTomato son las más fotoestables; pero la segunda, al ser dimérica, posee el doble de peso molecular lo que la limita su utilidad como *tag*, pues puede interferir el plegado normal de la proteína de interés. mCherry ha sido utilizada con éxito en el marcado de tonoplasto, lumen de RE, membrana plasmática y Golgi (Nelson y col., 2007). Si bien la utilización de las proteínas rojas es atractiva para varias aplicaciones, la autofluorescencia del tejido vegetal debe ser tomada en cuenta cuando se trabaja con fluorocromos que absorben/emiten en la región roja del espectro visible.

Al momento de seleccionar PFs como marcadores podemos seguir varias guías publicadas, entre ellas Shaner y col., (2005) recomiendan buscar las siguientes características:

- ✓ Que la FP se exprese de manera eficiente y no ejerza un efecto tóxico en el huésped
- ✓ Que su brillantez brinde una señal lo suficientemente superior a la autofluorescencia, para ser detectada de manera confiable.
- ✓ Que su fotoestabilidad permita detectarla durante todo el experimento.
- ✓ De ser necesario expresarla fusionada a otra proteína de interés entonces, no debe oligomerizarse.
- ✓ Que no se vea afectada por fenómenos ambientales.
- ✓ Y en experimentos de marcados múltiples, el set de PFs elegido debería tener el mínimo de superposición en los espectros de excitación y emisión.

TABLA 1.4: Propiedades de algunas proteínas fluorescentes

Clase	Proteína fluorescente	Ex (nm)	Em (nm)	Brillan-tez	Rendimiento cuántico	Fotoes-tabilidad	pKa	Oligomeri-zación	Fuente
Rojo lejano	mPlum	590	649	4.1	0.10	53	<4.5	Monomero	Wang y col., 2004
Rojo	mCherry	587	610	16	0.22	96	<4.5	Monomero	Shaner y col., 2004
	tdTomato	554	581	95	0.69	98	4.7	Dimero en tandém	Shaner y col., 2004
	mStrawberry	574	596	26	0.29	15	<4.5	Monomero	Shaner y col., 2004
	J-Red	584	610	8.8	0.20	13	5.0	Dimero	www.evrogen.com
	DsRed-monomer	556	586	3.5	0.10	16	4.5	Monomero	www.clontech.com
Naranja	mOrange	548	562	49	0.69	9.0	6.5	Monomero	Shaner y col., 2004
	mKO	548	559	31	0.60	122	5.0	Monomero	Karasawa y col., 2004
Amarillo-Verde	mCitrine <sup>i</sup>	516	529	59	0.76	49	5.7	Monomero	Griesbeck y col., 2001; Zacharias y col., 2002
	Venus	515	528	53	0.57	15	6.0	Dimero débil	Nagai y col., 2002
	YPet	517	530	80	0.77	49	5.6	Dimero débil	Nguyen, y Daugherty, 2005
	EYFP	514	527	51	0.61	60	6.9	Dimero débil	Tsien y col., 1998
Verde	Emerald	487	509	39	0.68	0.69	6.0	Dimero débil	Tsien y col., 1998
	EGFP	488	507	34	0.60	174	6.0	Dimero débil	www.clontech.com
Cyan	CyPet	435	477	18	0.51	59	5.0	Dimero débil	Nguyen, y Daugherty, 2005
	mCFPm	433	475	13	0.40	64	4.7	Monomero	Zacharias y col., 2002
	Cerulean	433	475	27	0.62	36	4.7	Dimero débil	Rizzo y col., 2004

Adaptado de Shaner y col., 2005

#### ***4. Estrategias que pueden emplearse para incrementar la acumulación de proteínas recombinantes.***

##### ***4.1. Estrategias empleadas en plantas***

Como se indicó anteriormente un primer aspecto a considerar es la elección de las señales que mejoren la eficiencia de los procesos de transcripción y de traducción. Las señales más comúnmente utilizadas han sido indicadas en la sección 2.2. Otro aspecto importante son las modificaciones co y postraduccionales requeridas para llegar a un producto biológicamente activo. La inclusión de secuencias que controlan el direccionamiento subcelular de la proteína es un método generalizado para mejorar los rendimientos de la proteína recombinante, debido a que el compartimento en el cual la proteína se acumula influye tanto en su plegamiento, ensamblado y modificaciones post-traduccionales como en la estabilidad (Twyman y col., 2003; Ma y col., 2003). De este modo, diferentes órganos de plantas (hojas semillas y raíces) o compartimientos subcelulares (ER, cloroplastos, mitocondrias, vacuolas o cuerpos lipídicos) han sido eficientemente utilizados para la síntesis de muchas biomoléculas (Faye y Gomord, 2009). Generalmente, el transgen es introducido en el genoma nuclear y el mismo es diseñado de forma tal que contenga aquella información necesaria para su direccionamiento, en algunos casos las señales de direccionamiento son múltiples. Igualmente, podemos mencionar que muchas proteínas producidas en plantas, han sido secretadas al espacio extracelular o el apoplasto de diferentes órganos como hojas, semillas y raíces para aumentar su producción (Goldstein y Thomas, 2004; Hellwig y col., 2004). El empleo de este tipo de señales puede hacerse tanto empleando células vegetales en suspensión o recurriendo a rizosecreción de cultivos hidropónicos, lo que facilita la recuperación de la proteína del medio, simplificando el proceso de purificación (Sharp y Doran, 2001).

Otra estrategia es la acumulación en retículo endoplasmático (RE), el cual provee un ambiente oxidante y abundante cantidad de chaperonas, mientras que el contenido de proteasas es bajo. Dependiendo del tamaño, la proteína puede ser retenida en la matriz de la pared celular o puede filtrarse fuera de la célula. Aunque la mayoría de las proteínas son más estables en el apoplasto que en el citosol, son incluso más estables en

el lumen del RE. Por este motivo, los niveles de expresión de los anticuerpos pueden ser incrementados si la proteína es retenida en el RE utilizando las señales H/KDEL C-terminal además del péptido señal (Conrad y Fiedler, 1998). Los niveles de acumulación varía entre 2 a 10 veces comparados con una proteína idéntica que carece de la señal KDEL (Schillberg y col., 2002). Como beneficio adicional, los anticuerpos retenidos en el RE no sufren las modificaciones del aparato de Golgi, lo que implica que poseen glicanos de alta manosa, pero no residuos de fucosa  $\alpha$ 1-3 y xilosa  $\beta$ 1-2 específicos de plantas (Sriraman y col., 2004)). Este tipo de estructura es deseable para evitar reacciones alérgicas, ya que esta clase de glicanos no se encuentran en proteínas de mamíferos, sin embargo para activar o inhibir muchas reacciones efectoras se requiere que los glicanos adicionados en el CH2 posean fucosa  $\alpha$ 1-6. La presencia de glicanos ricos en manosa disminuye notoriamente la vida media en sangre y se ha mostrado que altera la estructura del Fc transformándolo en inmunogénico (Petruccioli y col., 2006). La expresión en plantas transgénicas, si bien posee como se mencionó muchas ventajas, puede generar productos de gran heterogeneidad. Por ejemplo, anticuerpos secretorios IgA/IgGs, que se esperaba que se acumulen en el apoplasto, se han encontrado en varios compartimentos subcelulares como vacuolas y el RE (Frigerio y col., 2000). Esta localización variable podría ser resultado de direccionamiento o plegamiento incorrecto y la heterogeneidad estructural sería consecuencia de las diferentes maduraciones proteolíticas que ocurren en el RE, vacuola y apoplasto. La maduración de las N-glicosilaciones también refleja la localización en la vía secretoria de la glicoproteína (Lerouge y col., 1998) y la heterogeneidad observada en las IgGs expresadas en tabaco, de la misma forma, puede deberse a su distribución subcelular heterogénea (Cabanès-Macheteau y col., 1999; Bakker y col., 2001). Entre los diferentes tejidos o compartimentos subcelulares que podrían utilizarse como blancos para el direccionamiento, para tratar de aumentar la estabilidad y el rendimiento de las proteínas heterólogas, se encuentran los órganos de reservas en semilla. Esta estrategia ha sido adoptada por varias empresas comerciales con el uso de semillas de cereales (Tabla 1, Hood y col., 1999; Ma y col., 2003; Horn y col., 2004; Menkhaus y col., 2004). La producción en semillas ofrece además la ventaja de que las proteínas pueden acumularse en un volumen pequeño y de manera estable por largos períodos a temperatura ambiente lo que abarata los procesos *downstream* (Kusnadi y col., 1997; Menkhaus y col., 2004; Stoger y col., 2005).

#### ***4.2. Estrategias empleadas en otros sistemas de expresión.***

Muchas empresas biotecnológicas ofrecen bacterias modificadas de forma tal que posean una mayor capacidad de plegamiento y exportación y en los últimos años este tipo de modificaciones se han empezado a extender a otros sistemas de expresión como células de levaduras, de ovario de hamster (*Chinese hamster ovary*, CHO), de *African Green Monkey Kidney* (COS), mielomas de ratón NSO y SP2 (Dinnis y James, 2005; Raden y col., 2005; Xu y col., 2005; Le Fourn y col., 2006; Rakestraw y Wittrup, 2006; Satoh y col., 2006; Carla Famá y col., 2007). Una de las modificaciones más comunes es la sobreexpresión de alguna chaperona, que aunque en algunos casos permite incrementar los niveles de acumulación de la proteína de interés; en otros casos es insuficiente, dada la gran cantidad de componentes que intervienen en estos procesos.

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que muchas proteínas biofarmacéuticas poseen modificaciones postraduccionales que sólo se logran cuando la misma es direccionada a la vía secretoria, por ejemplo hormonas, factores de crecimiento, proteínas séricas, etc. La sobreexpresión de una proteína secretoria se encuentra limitada por los mecanismos de control de calidad, que operan en el retículo endoplásmico (RE), y por la capacidad de la maquinaria que la transporta a través del RE, aparato de Golgi, hasta su destino final en el espacio extracelular. Esta maquinaria de plegamiento y transporte es sumamente compleja y existen numerosos pasos de control de calidad por lo que alcanzar altos niveles de producción es difícil. Es por ello que, en los últimos años, se han empezado a emplear la transcriptómica, proteómica e interactómica para realizar un abordaje más integral de este problema (Gasser y col., 2007), de forma de proponer estrategias que tengan en cuenta a la maquinaria involucrada en los procesos de plegado, modificación y transporte de la proteína.

**CAPÍTULO II:**  
***HIPÓTESIS Y***  
***OBJETIVOS***

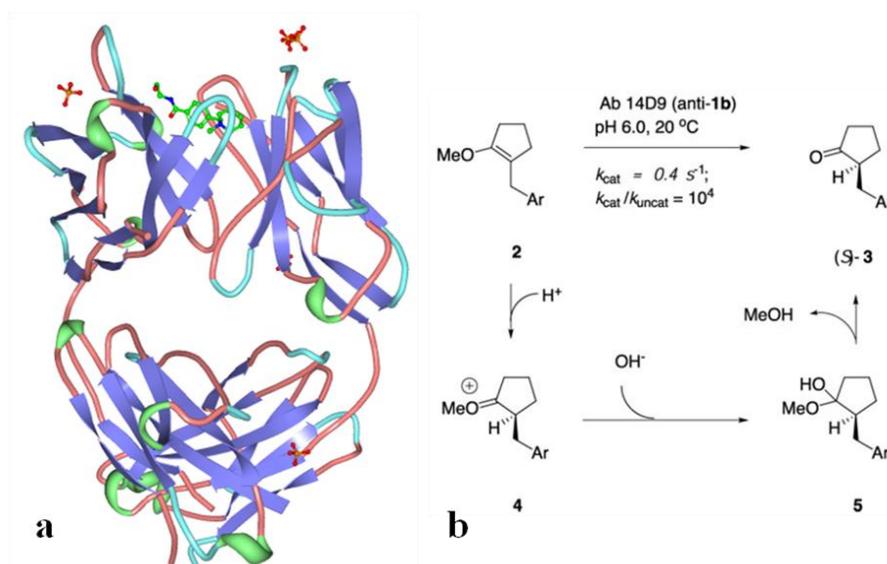
## **CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### ***Construcción de la hipótesis de trabajo y objetivos del trabajo***

Teniendo en cuenta la necesidad de desarrollo de sistemas de producción de anticuerpos con alta capacidad de producción, la complejidad estructural de las inmunoglobulinas y las estrategias para mejorar la capacidad de síntesis de proteínas de interés que se vienen empleando en otros sistemas de expresión y en plantas, se planteó el desarrollo de un sistema reportero. A fin de evaluar factores que afecten al plegado y modificaciones postraduccionales de la inmunoglobulina así como también componentes de la maquinaria de transporte y secreción generales. Este sistema reportero permitiría investigar en un futuro cómo determinados genes afectan la producción de proteínas secretorias o bien utilizar una aproximación genómica para desarrollar y caracterizar líneas celulares con capacidad incrementada de secreción. Como se ha sido informado algunos de los componentes de la maquinaria plegado y secreción son específicos de determinadas proteínas, por lo que para desarrollar el sistema de la vía secretoria se planteó utilizar como base una inmunoglobulina. Para este desarrollo se empleó el anticuerpo monoclonal 14D9 (ver figura 7) que es una inmunoglobulina G1 murina que cataliza la transformación estereo selectiva de enoles quirales (Reymond y col., 1993). Aunque este anticuerpo no posee interés farmacéutico presenta aplicaciones potenciales en síntesis orgánica.

### ***Hipótesis***

La hipótesis planteada fue que la fusión de los genes de inmunoglobulinas a genes codificantes para proteínas fluorescentes permitiría el desarrollo de un sistema que permita evaluar la síntesis y acumulación de inmunoglobulinas en plantas.



**Figura (2.1).** (a) Estructura de la unidad biológicamente activa del anticuerpo 14D9 (1UWG). Fuente: PDB. (b) Reacción catalizada por el anticuerpo 14D9. Fuente: *Reymond y col., 1992*.

## Objetivos

El objetivo general fue la construcción de una inmunoglobulina reportera y su expresión en plantas a fin de evaluar la factibilidad de generar un reportero funcional.

Los objetivos específicos fueron:

**Objetivo 1:** Diseñar y construir una fusión del gen codificante para la cadena liviana del anticuerpo 14D9 a proteínas fluorescentes (kappa-PF).

**Objetivo 2:** Estudiar la síntesis y localización subcelular de la fusión Kappa-PF por expresión temporal.

**Objetivo 3:** Estudiar la síntesis y localización subcelular de la fusión Kappa-PF en presencia de la cadena pesada.

**CAPÍTULO III:**  
***MATERIALES Y***  
***MÉTODOS***

## **CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***1 Materiales***

#### ***1.1 Material biológico***

❖ Plantas de *Nicotiana benthamiana* jóvenes (4-5 semanas), crecidas en cámara de 23 C con foto período 16:8h (luz: oscuridad.).

❖ Plantas de *Arabidopsis thaliana* (*Columbia*) crecidas en cámara de 23 C con fotoperíodo 16:8h (luz: oscuridad.)

❖ *Escherichia coli*:

**DH5 $\alpha$** : F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17( $r_K^-$   $m_K^+$ ),  $\lambda^-$ . Utilizada en clonados convencionales.

**TOP10** (*OneShot*® *TOP10*, Invitrogen Argentina, SA): F<sup>-</sup> mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1  $\lambda^-$  Utilizada en clonados que requieren alta eficiencia de transformación.

**DB3.1**: F<sup>-</sup> gyrA462 endA1 glnV44  $\Delta$ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5  $\Delta$ leu mtl1. Utilizada para amplificar los vectores Gateway que contienen el gen tóxico *ccdB*.

❖ *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 que porta el plásmido pMP90, que posee el gen de resistencia a la gentamicina y que lleva los genes necesarios para la transferencia del T-DNA.

### ***1.2 Medios de cultivos para bacterias***

- ❖ Medio Luria-Bertani (LB): Triptona 10 g/L; Extracto de levadura 5g/L; NaCl 0,09 M; Glucosa 5,5.10<sup>-3</sup>M. Para lograr medios sólidos de cultivo se adicionó 15 g/L de agar (Merck).
- ❖ Medio YEB: Triptona 10 g/L; Extracto de levadura 5g/L; Extracto de carne 5g/L; NaCl 0,09 M; Glucosa 5,5.10<sup>-3</sup>M. Para lograr medios sólidos de cultivo se adicionó 15 g/L de agar (Merck).
- ❖ Medio de Infiltración (MI): 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich), 10 mM ácido morfolinoetansulfónico (MES, Sigma Aldrich)), pH 5.7.

### ***1.3 Soluciones de antibióticos empleadas***

Para selección de bacterias: todas las soluciones *stock* se prepararon en agua a una concentración 1000 veces superior (1000X) a la de trabajo. Las concentraciones de las soluciones stock fueron 50mg/m para ampicilina (Sigma Aldrich), kanamicina (Sigma Aldrich), y gentamicina (Sigma Aldrich).

### ***1.4 Vectores plasmídicos utilizados***

- ❖ Vectores de clonado: Como vector de clonado se utilizó el plásmido pENTR<sup>TM</sup>/TEV/D-TOPO (Invitrogen Argentina, SA), este vector permite el clonado direccional de productos de PCR con extremos romos (Figura anexa 3.1). El vector pMonAmh, que posee resistencia a ampicilina, fue utilizado para la construcción del marcador de peso molecular mediante la digestión con *Hind III* (Invitrogen Argentina, SA).
- ❖ Vector binario: Para las transformaciones mediadas por agrobacterias, se utilizó el vector binario pGWB2 (Nakagawa, et al. 2007) (Figura anexa 3.2).
- ❖ Vectores utilizados como moldes de DNA: La secuencia codificante de la cadena liviana del anticuerpo 14D9 fue aislada por PCR del plásmido pRTL202-35::KaKDEL (Petruccelli y col., 2006). La proteínas rojas fluorescentes

utilizadas mCherry (*monomeric Cherry*) y tDTomato (*tandem dimeric Tomato*) fueron aisladas por PCR desde los plásmidos ER-Cherry CD3-959 (Nelson y col., 2007) y ER-tDTomato (Snapp y col., 2006).

### 1.5 Primers utilizados

Se utilizaron los siguientes *primers* específicos (Tabla 1) para amplificar los genes de: las proteínas fluorescentes rojas elegidas (mCherry y tDTomato), el gen codificante de la cadena liviana del anticuerpo monoclonal 14D9 y las respectivas fusiones. El *primer* directo M13 fue utilizado para verificar la dirección del inserto durante el clonado en el vector pENTR<sup>TM</sup>/TEV/D-TOPO (Invitrogen Argentina, SA), mientras que el par 35-S fue utilizado en el *screening* durante el clonado en el vector binario

### 1.6 Herramientas utilizadas para el análisis de secuencia y el diseño de los primers

Las secuencias nucleotídicas codificantes de las proteínas a clonar, así como las secuencias aminoacídicas, fueron descargadas de la base de datos de Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

- ❖ **Align Plus 5, versión 5.11 (Sci Ed Central):** Alineamiento local de las secuencias nucleotídicas de las proteínas fluorescentes rojas utilizando una secuencia como referencia.
- ❖ **Primer Designer 5, versión 5.11 (Sci Ed Central):** diseño y análisis de primers de amplificación y fusión de las secuencias de interés.
- ❖ **Clone Manager 7, versión 7.11 (Sci Ed Central):** Este programa se utilizó para llevar a cabo reacciones virtuales de pcr, que permitieron verificar la continuidad de los marcos de lectura de las construcciones de fusión, y el clonado de las construcciones obtenidas en los vectores de clonación y expresión los cuales fueron digeridos enzimáticamente y establecidos de esta manera los patrones de digestión esperados.
- ❖ **CLUSTALW** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>): Se realizó el

alineamiento de las secuencias de las proteínas rojas a través del método neighbor-joining

- ❖ **Gene Doc Multiple Sequence Alignment Editor and Shading Utility (versión 2.7.000):** Este programa fue utilizado para analizar los alineamientos de las secuencias aminoacídicas.

TABLA 3.1: Secuencias de los primers utilizados para la amplificación de los genes de interés y su denominación.

Denominación	Secuencia nucleotídica
Forward-PS	5'-CACCATGGGCTGGAGCTGGATC-3'
Reverso-Fusión	5'-CTCCTCGCCCTTGCTCACCATCTCAGAACACTCATTCTCTGAAGCT-3'
Forward-PF	5'-GGTGGGTACCGGCTAGCACCAATGGTGAGCAAGGGC-3'
Reverso-PF	5'-TTACTTGTACAGCTCGTCC-3'

### 1.7 Enzimas recombinantes

- ❖ DNA polimerasa *Taq* (Fermentas): esta enzima posee además actividad transferasa terminal 3'→5' incorporando en los extremos de las secuencias amplificadas bases nucleótidos de timidina adicionales.
- ❖ DNA polimerasa *Pfx* (Invitrogen Argentina, SA): esta enzima posee además de su actividad polimerasa 3'-5', actividad 5'→3' exonucleasa que le confiere *proof-reading* (lo que le confiere menor probabilidad de incorporar errores que la DNA polimerasa *Taq*) y genera productos con extremos romos.
- ❖ Enzimas de restricción: *EcoRV* (Invitrogen Argentina, SA:), *HindIII* (Invitrogen Argentina, SA:) y *MluI* (Roche Applied Science) y *XhoI* (Invitrogen Argentina, SA).

## 2. Metodologías

### 2.1 Reacciones de PCR

Se emplearon dos estrategias de fusión por PCR: OE-PCR (*Overlap extension polymerase chain reaction*) (Ho y col., 1989; Heckman y Pease, 2007) y *Megaprimer* (Sarkar y Sommer, 1990). En ambos casos se realizan PCRs iniciales en las cuales se amplifican fragmentos que poseen segmentos complementarios en sus extremos, los cuales son utilizados posteriormente para un segundo PCR que dará lugar al producto entero. La complementariedad en las secuencias es incorporada por los *primers*, permitiendo fusionar genes y/o introducir o eliminar secuencias.

#### Condiciones de amplificación por PCR

Se utilizaron las DNA polimerasas termoestables *Taq* y *Pfx*, la composición de la mezclas de reacción para cada una de ellas se presenta en la tabla (2). La reacciones de PCR que se realizaron para poner a punto las condiciones de amplificación o para el *screening* de las clones; fueron llevadas a cabo en un volumen final de 15  $\mu$ l utilizando la DNA polimerasa *Taq*. En el caso de los PCR preparativos se utilizó un volumen final de 50  $\mu$ l y la DNA polimerasa *Pfx*.

La tabla (3) muestra el programa de amplificación utilizado para cada enzima. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un ciclador térmico *Gradient MyCycler™ (Bio-Rad)*.

TABLA 3.2: Mezclas de reacción de PCR utilizadas para las DNA polimerasas *Taq* y *Pfx*

Pfx DNA polimerasa		Taq DNA polimerasa	
Componente	Concentración final	Componente	Concentración final
<i>Primer</i> reverso	0,3 $\mu$ M	<i>Primer</i> reverso	0,3 $\mu$ M
<i>Primer</i> directo	0,3 $\mu$ M	<i>Primer</i> directo	0,3 $\mu$ M
<i>Buffer Pfx</i> (Invitrogen) 10X	1X	<i>Buffer Taq</i> (Fermentas) 10X	1X
MgSO <sub>4</sub>	1 mM	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
dNTPs	0,3 mM de cada uno	dNTPs	0,3 mM de cada uno
Enzima	1-2,5 U	Enzima	1-2,5 U
PCRx <i>Enhancer Solution</i> 10X	1X	-	-

TABLA 3.3: Programa de amplificación utilizado en todas las reacciones de PCR

Etapa	<i>Pfx</i> DNA polimerasa	<i>Taq</i> DNA polimerasa	Tiempo (minutos)
	Temperatura (°C)		
I) desnaturalización inicial	94		4
II) annealing	T annealing		0.5
35 ciclos III) amplificación	72	68	1/kb
IV) desnaturalización	94		2
V) amplificación adicional	72	68	4

## 2.2 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Las muestras de DNA plasmídico, productos de digestión enzimática y los fragmentos de amplificación de PCR fueron analizadas en geles de agarosa en un rango entre 1 % y 2 % p/v de acuerdo al tamaño de los fragmentos a separar. La agarosa se disolvió en *buffer* TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y se agregó bromuro de etidio (BrEt) para visualizar las bandas. Antes del sembrado se agregó a las muestras 1/4 volumen de *buffer* 4X de siembra para DNA (*buffer* Tris-HCl 20 mM pH 8,0, glicerol 50 % p/v, azul de bromofenol 1 % p/v, EDTA 2 mM pH 8,0). Las electroforesis se llevaron a cabo en *buffer* TAE 1,0X a voltaje constante (90V). Para visualizar y registrar las corridas electroforéticas se utilizó un transiluminador de UV (UVP) y los geles fueron digitalizados con la cámara Cámara Kodak Z 712 IS (7.1 Megapixels) con un Filtro Naranja para Bromuro de Etidio.

## 2.3 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa utilizando un kit comercial

Para la purificación de los fragmentos amplificados por PCR y de fragmentos provenientes de digestión enzimática de plásmidos se utilizó el kit de purificación *HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction minikit*, (BioAmerica Inc) procediendo según lo recomienda el fabricante. Se cortaron las bandas del gel de agarosa que poseían los fragmentos relevantes de DNA y se colocaron en un tubo de 1,5 ml adicionando posteriormente 0,5 ml de *buffer* de dilución (*DF buffer*) y mezclando en vortex. Las muestras se incuban a 55°C durante 10 o 15 minutos y luego se dejan enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Las muestras se transfieren a las columnas de

purificación (*DF Column*) donde son sometidas a varios pasos de lavado y finalmente el DNA es eluído de la columna con agua bidestilada estéril y recuperado en un tubo de 1,5 ml estéril. Las muestras de DNA recuperadas fueron, en todos los casos, almacenadas a -20°C

#### **2.4 Clonado en pENTR<sup>TM</sup>/TEV/D-TOPO (Invitrogen)**

El clonado de fragmentos de PCR se realizó en el plásmido pENTR, que no requiere un paso de ligación, en cambio el inserto es introducido en el plásmido mediante la reacción TOPO que utiliza la enzima TOPO isomerasa que se encuentra conjugada al vector. El protocolo de la reacción fue modificado, se puso en contacto 1-5 ng del fragmento amplificado con 1 µl del vector pENTR<sup>TM</sup>/TEV/D-TOPO agregando 1 µl de solución salina. Este volumen se incubó a temperatura ambiente durante 2 hs. y se utilizó la mezcla completa de la reacción para transformar células competentes químicas de *E. coli* DH5- $\alpha$  mediante *shock* térmico. Las células se incubaron en medio agar LB a 37 °C por 24 hs seleccionando a través de la resistencia a kanamicina.

#### **2.5 Recombinación sitio específica mediante el sistema Gateway (LR clonasa)**

Se realizó la recombinación sitio específica utilizando 1 µl del fragmento liberado por incubación con *MluI* del vector pENTR que contenía el inserto de interés (fragmento que fue purificado del gel de electroforesis) y 1 µl del vector de destino (100 ng/µl) pGBW2, con 1 µl la enzima LR clonasa. Se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Luego de este paso se adicionaron 2 µl de proteinasa K para inactivar la enzima incubando 10 min a 37 °C. Con la mezcla obtenida se transformaron células competentes *One Shot® Chemically Competent E. coli TOP10* (Invitrogen). Posteriormente se seleccionaron las transformantes mediante la selección en medio agar LB con Kanamicina (antibiótico correspondiente a la resistencia codificada en el vector pGBW2).

## ***2.6 Transformación química de células competentes de E.coli DH5- $\alpha$ y 1 One Shot® Chemically Competent E. coli (Invitrogen)***

El *stock* de células competentes se retira del *freezer* (-80°C) cinco minutos antes de llevar a cabo la transformación, siendo colocado inmediatamente en hielo donde se deja descongelar la mezcla. Posteriormente se adiciona la preparación de plásmido y se incuba en hielo durante 30 min, el volumen adicionado dependerá del origen de la preparación: 1  $\mu$ l para minipreparación de DNA y en el caso de las reacciones TOPO y LR, se utiliza toda la mezcla. A continuación, se procede a realizar el *shock* térmico colocando la preparación en un block, previamente estabilizado a 42°C, durante 30 segundos e inmediatamente volver a colocar en hielo durante 2 minutos. Se adicionan 250  $\mu$ l de medio de cultivo S.O.C. (precalentado a 37°C) y se incuba 1h a 37°C con una agitación de 200 rpm en el *shaker* (LabLine). Se siembra todo el cultivo, en mechero o flujo laminar, con varilla de vidrio, en placas con agar LB con el antibiótico de selección (Kanamicina, concentración final 50  $\mu$ g/ml). Como control se lleva a cabo el mismo procedimiento pero esta vez no se adiciona plásmido a las células, la aparición de colonias indicaría algún tipo de contaminación.

## ***2.7 Minipreparación de DNA plasmídico***

La purificación de DNA plasmídico se realiza mediante el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979), con modificaciones. Una alícuota de 1.5 ml de cultivo bacteriano crecido toda la noche con agitación, se centrifuga a 14000g durante 1 minuto (este procedimiento se puede repetir hasta tres veces para concentrar en el caso de los plásmidos baja copia como los derivados de pGWB2). El precipitado obtenido se resuspende en 300  $\mu$ l de Solución I (25 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM glucosa; 10 mM EDTA) con lisozima a una concentración final de 0,5mg/ml. Seguido, se agregan 300  $\mu$ l de Solución II (0,2 N NaOH; 1 % v/v SDS) y se incuba en agua-hielo durante 5 minutos. Luego se neutraliza con 300  $\mu$ l de Solución III (3M acetato, 5M potasio pH 4.8) y se incuba en agua-hielo durante 5 minutos. Se realiza una centrifugación a 14000g por 15 minutos. Al sobrenadante obtenido se le agrega RNAsa A, a una concentración final de 20  $\mu$ g/ml, incubando luego a 37°C por 10 minutos.

Posteriormente se realizan dos extracciones con 1 volumen de cloroformo para eliminar proteínas y se precipita el DNA plasmídico presente en la fase acuosa por el agregado de 0,7 volúmenes de isopropanol. Se centrifuga por 10 minutos a 14000 x g. El precipitado obtenido se lava con etanol 70 % y por último se resuspende en 20 µl de agua bidestilada estéril.

En algunos casos se emplearon kits comerciales: Wizard (Promega), QiaPrep (Qiagen) y/o Illustra (GE Healthcare) siguiendo las recomendaciones especificadas por el comerciante.

### ***2.8 Diálisis de DNA***

Para poder llevar a cabo un procedimiento de transformación por electroporación se requiere contar con una muestra de DNA plasmídico de baja concentración de sales. Por este motivo se dialisaron las preparaciones plasmíticas que fueron llevadas a cabo mediante la técnica de lisis alcalina previamente mencionadas, no así aquellas preparaciones plasmíticas que fueron realizada utilizando el kit comercial (la preparación es de elevada pureza en este caso). Se utilizaron las membranas de diálisis *Millipore* (0.05 µm). Estas fueron depositadas en un recipiente que contenía agua bidestilada y sobre ella se colocó la preparación plasmídica en forma de gota, y se incubó por 2 hs a temperatura ambiente.

### ***2.9 Digestiones enzimáticas***

Se realizaron digestiones de aproximadamente 500 ng de plásmido usando las enzimas de restricción *HindIII*, *Mlu I* o *Xho I* y *EcoRV*. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando 10 U de cada enzima en el *buffer* correspondiente (Promega), en un volumen final de 20 µl con agua bidestilada estéril. Las mezclas de reacción fueron incubadas toda la noche a 37 °C.

### 2.10 Colony-PCR

Éste método fue utilizado como screening durante el clonado en el presente trabajo. Se procedió a alicuotar la mezcla de PCR (con la enzima adicionada) en los tubos de PCR (se trabaja en hielo), con una punta de micropipeta se levantaba una pequeña fracción de uno de las colonias a analizar y se sembraba en una placa limpia, con el mismo *tip* se introducía el molde en el tubo de PCR. Los tubos se colocan en el termociclador y se procede con la reacción de la misma forma que realizaron otras reacciones de PCR.

### 2.11 Transformación de *A. tumefaciens*

Se retira el vial de células GV3103 electrocompetentes del *freezer* (-80°C) y se coloca inmediatamente en hielo. La cubeta de electroporación de 2mm (Bio-Rad) se coloca en hielo 10 min antes de llevar a cabo la transformación. Se mezcla 1 µl de preparación plasmídica (dializada de ser necesario) con 100µl de células, se coloca la mezcla inmediatamente en la cubeta y se incuba 1 min en hielo. A continuación, se coloca la cubeta en el electroporador (Bio-Rad Gene Pulser) y se procede a electroporar bajo las siguientes condiciones:

- ✓ Capacitancia: 25 µF
- ✓ Voltaje: 2.5 KV
- ✓ Resistencia: 200 Ω

Inmediatamente después de electroporar se adicionan 1000 µl de medio S.O.C. (pre-calentado a 37°C) y se vuelca la mezcla en un tubo limpio y estéril. Se incuba ON en agitación (200 rpm) a 28°C. Posteriormente, se siembra, en esterilidad y con varilla de vidrio, toda la transformación en placas YEB con el antibiótico de selección y gentamicina. Como control se lleva a cabo el mismo procedimiento pero esta vez no se adiciona plásmido a las células, la aparición de colonias indicaría algún tipo de contaminación.

### **2.12 Agroinfiltración de plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana***

Los ensayos de agroinfiltración se efectuaron de acuerdo al método descrito por Batoko y col., (2000). Para ello se cultivó un clon de *A. tumefaciens*, conteniendo el plásmido binario correspondiente, en medio YEB líquido con los antibióticos adecuados a 28 °C durante toda la noche, en oscuridad y agitación (200 rpm). Se procedió a inducir el cultivo agregando acetosiringona (concentración final 200 mM) y se incubó de 2-4 hs. Se diluyó el cultivo en medio de infiltración 1X con el agregado de acetosiringona (concentración final 200 mM) a una DO<sup>600</sup> de entre 0,1 y 0,6 dependiendo del experimento. Se incubó durante 3hs a temperatura ambiente. Se infiltró la superficie abaxial de las hojas de *N. benthamiana* (o *A. thaliana*) utilizando una jeringa de 1 ml sin aguja. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz, a 22-24 °C durante 72hs.

### **2.13 Microscopía de disección fluorescente y microscopía de fluorescencia confocal**

Luego de 72 hs de incubación, las hojas agroinfiltradas fueron analizadas por microscopía. En el caso de la microscopía de disección fluorescente, se utilizó lupa UV Leica MZ10F con filtros GFP3 ( excitación 470/40nm , emisión 525/50 nm ), GFP ( excitación 425/60nm , emisión 480 nm ), YFP ( excitación 510/20nm , emisión 560/40 nm ) y dsRed ( excitación 545/30nm , emisión 620/60 nm ) acoplada a una Cámara Digital DFC490. Los estudios de microscopía de fluorescencia confocal se realizaron utilizando el microscopio espectral LeicaTCS SP5 utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 63X (HCX PL APO CS 63.0x1.40 OIL UV). mCherry y tDTomato fueron excitadas a 594 nm y detectadas en un rango de 597 a 630 nm . YFP fue excitada a 514 nm y su rango de emisión fue de 525 a 559 nm. GFP se excitó a 488 nm y se detectó en un rango de 496 a 532 nm. Las determinaciones simultáneas fueron llevadas a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante.

***CAPÍTULO IV:***  
***RESULTADOS Y***  
***DISCUSIÓN***

## **CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### ***1. Diseño experimental***

El objetivo general de este trabajo, como se mencionó previamente, fue generar una inmunoglobulina fusionada a una proteína fluorescente que en un futuro pudiera utilizarse como sistema reportero para estudiar factores que modifiquen la capacidad de síntesis y acumulación de anticuerpos en plantas. El anticuerpo catalítico 14D9 fue escogido como modelo, planteándose fusionar el gen reportero a su cadena liviana kappa (K14D9). Para poder llevar a cabo este proyecto, en primer lugar se debió establecer los requerimientos de la construcción para permitir su expresión y direccionamiento correctos en plantas.

- *Direccionamiento a la vía secretoria y secreción*: necesario para que se lleven a cabo las modificaciones post-traduccionales que requiere el anticuerpo. Para ello, se requiere de un péptido señal (SP, *signal peptide*) en el N-terminal de la proteína de fusión que determine que la unión de los ribosomas al RE. Debido a que esta secuencia SP se encuentran altamente conservadas entre los organismos eucariotas se optó por mantener el péptido señal de una inmunoglobulina de ratón empleando el vector pRTL202 (Petruccelli y col., 2006). Una vez que la proteína ha sido introducida en el sistema de endomembranas, en ausencia de otra señal de direccionamiento el camino “*default*” es la secreción de la proteína al apoplasto (Denecke y col., 1990).
- *Remoción del codón de stop de la secuencia codificante para K14D9 e incorporación de un linker*: Se decidió hacer una fusión en el C-terminal de la cadena K14D9 pues en el N-terminal está el SP que es específicamente clivado. Por lo tanto, la estrategia debía contemplar la remoción del codón de stop en la secuencia nucleotídica codificante de K14D9. Cuando se realizan fusiones traduccionales es necesario en muchos casos incorporar algunos aminoácidos que actúen de *linker* entre los dos polipéptidos, permitiendo el plegamiento correcto e independiente de cada uno de ellos. En este caso el *linker* utilizado

fue de solo dos aminoácidos (SE), el cual había mostrado buenos resultados en la fusión de 14D9 a la secuencia KDEL de retención en retículo (Petruccelli y col., 2006). La secuencia nucleotídica del mismo se encuentra optimizada para los codones de común uso en *A. thaliana*, de manera de minimizar las posibilidad de problemas a nivel traduccional por limitación en tRNAs.

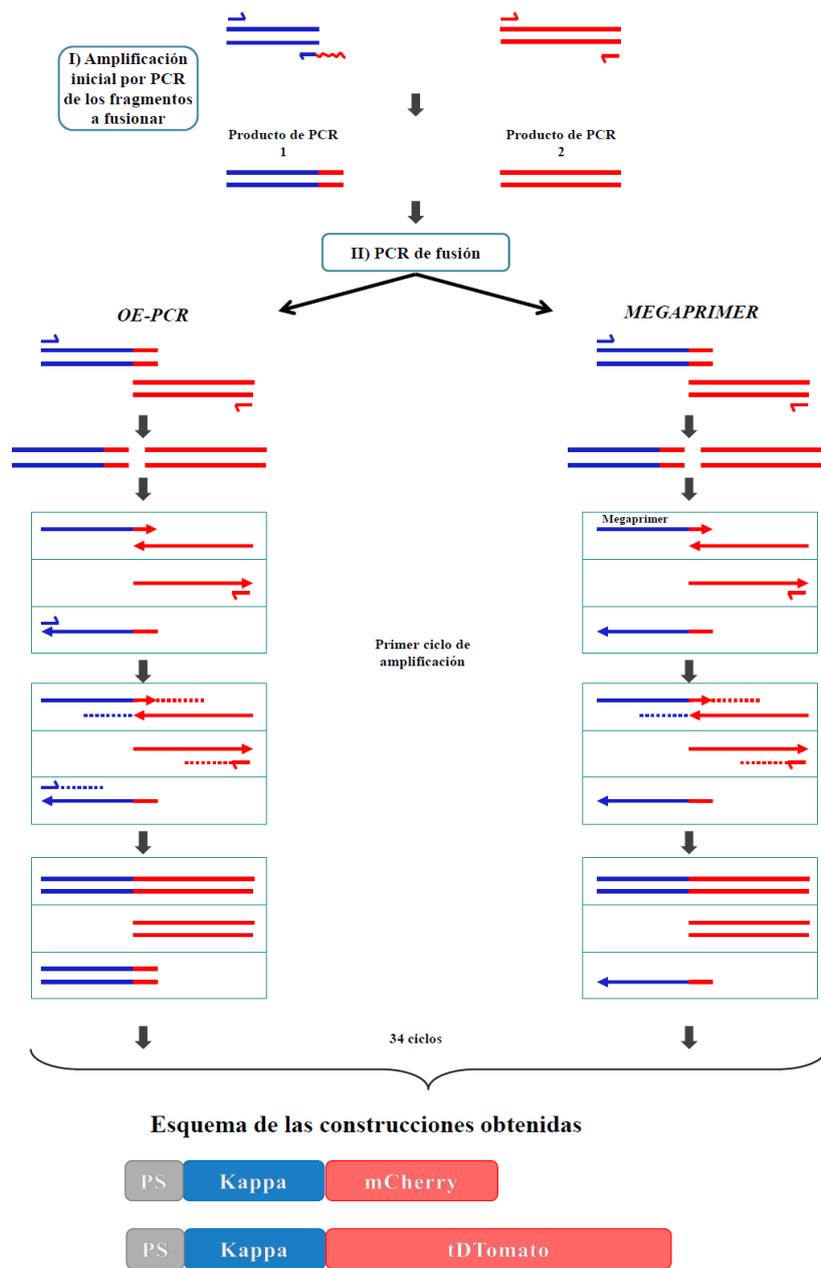
- Promotor, secuencias reguladoras y secuencias UTR 5' y 3': Como se pretende expresar la construcción en hojas y de manera constitutiva, el promotor elegido fue el CaMV 2E-35S, que es más fuerte que el promotor original 35S, junto con la secuencia de terminación 35ST. El vector contiene la secuencia líder de TEV (5' UTR) para mejorar la traducción y también una secuencia de Kozak. Todas estas secuencias están incluidas en pRTL202-35::KaKDEL (Petruccelli y col., 2006).
- Estrategia de fusión de las secuencias de K14D9 y las secuencias del gen reportero: para fusionar las secuencias se eligió utilizar un PCR de fusión, esta técnica requiere de la utilización de *primers* que incorporen secuencias superpuestas en los extremos de los genes a fusionar en un primer PCR, y a continuación las secuencias amplificadas son utilizadas en segundo evento de PCR (ver figura 4.1). Este método tiene la ventaja de evitar la utilización de enzimas de restricción y ligaciones para fusionar los genes, asegurando la continuación del marco de lectura y permitiendo la incorporación y remoción de nucleótidos en un único paso.
- Sistema de clonado de alta eficiencia: Para clonar la construcción de fusión se decidió utilizar el sistema *Gateway* (Invitrogen), un método universal de clonado basado en las propiedades de recombinación sitio-específica del bacteriófago *lambda* (Landy, 1989). Esta tecnología provee de una rápida y altamente eficiente manera de mover secuencias de DNA a múltiples sistemas de vectores para análisis funcional y expresión de proteínas (Hartley y col., 2000). Para llevar a cabo el clonado en este sistema se debe generar primero un clon de entrada, entre las múltiples posibilidades se eligió clonar en pENTR/TEV/D-TOPO, el cual permite el clonado direccional del inserto con solo la incorporación de la secuencia CACC en el *primer* directo utilizado para

amplificar la secuencia de interés. A continuación el clon de entrada deberá ser sometido a una reacción de recombinación (reacción LR) que dará lugar a la incorporación del inserto en el vector de destino.

- Elección de la proteína fluorescente (PF) utilizada para marcar K14D9: Para la elección de la PF debemos considerar en primer lugar, que se pretende generar una proteína de secreción, ésta debería ser estable al pH ácido del apoplasto. En segundo lugar, se desean hacer estudios de co-localización con  $\gamma$ -YFP, por lo tanto es indispensable elegir una PF cuyo espectro de excitación/emisión se superponga lo menos posible con el de YFP. Entre las proteínas posibles, las rojas mCherry y tDTomato (ver tabla 1.4) son la mejor opción por ser además altamente fotoestables. La segunda es mucho más brillante pero presenta la desventaja de ser dimérica, lo que podría afectar de manera importante el plegado correcto de K14D9 y/o su capacidad de formar el anticuerpo completo. Se decidió entonces, armar dos construcciones de fusión en lugar de una.

Se generaron dos construcciones de fusión secretorias:

- ❖ PS-Kappa-mCherry
- ❖ PS-Kappa-tDTomato



**Figura (4.1)** Estrategias evaluadas para la fusión de las secuencias codificantes de PS-Kappa y la PF: Se decidió realizar la fusión mediante dos métodos de PCR, el método de *Megaprimer* y el *OE-PCR* (*Overlapping extension PCR*). Como puede observarse ambos requieren un paso inicial de amplificación, en el cual se les incorporan fragmentos superpuestos a las secuencias a fusionar. A continuación se procede con la amplificación de fusión: en el caso del *OE-PCR* los dos fragmentos amplificados previamente son utilizados como molde y los *primers* son los externos; mientras que en el otro caso solo se utiliza el primer reverso y la secuencia de PS-Kappa hace las veces “*megaprimer*” directo. La diferencia radica en que en el segundo método no es amplificada la secuencia PS-Kappa sola, esto es recompensado con una mayor concentración de esta secuencia en la mezcla de reacción.

### ***1.1 Análisis de las secuencias y diseño de primers***

Teniendo en cuenta la estrategia de fusión y clonado elegidas se procedió a diseñar los *primers*. Para el diseño del par de *primers* para amplificar la secuencia codificante de K14D9, se partió de la construcción 35::KaKDEL (Petruccelli y col., 2006), clonada con el PS murino, y para la cual se agregó la secuencia codificante de SEKDEL antes del stop (ver figura anexa 1.1). El *primer* directo diseñado para ese clonado es aplicable este trabajo, pues amplifica la secuencia de K14D9 con el PS y adiciona en el 5' las bases CACC que, como ya fue mencionado, permiten el clonado direccional en la familia de vectores pENTR™ (Invitrogen).

En cuanto a las proteínas fluorescentes, ambas fueron mejoradas para tener una mayor tolerancia a fusiones en el N- y el C-terminal mediante la incorporación de extremos pertenecientes a la secuencia de GFP (Shaner y col., 2004). Es por éste motivo que se pretendía poder amplificar ambas proteínas con el mismo juego de *primers*. El laboratorio cuenta con un *primer* directo diseñado amplificar RFP (Forward-PF), si bien éste posee una secuencia adicionada en el extremo 5' esta no afecta la fusión pues se remueve en el PCR de fusión. Para analizar este *primer* y diseñar el *primer* reverso (o ambos *primers* de no funcionar el directo) primero se realizó un alineamiento global entre las secuencias (ver figura anexa 1.2) y se seleccionó la extensión máxima que podrían tener los *primers* para ser capaces de amplificar las dos secuencias. A continuación mediante el programa **Primer Designer 5, versión 5.11 (Sci Ed Central)** se diseñó el *primer* reverso y se verificó, mediante un PCR *in silico*, la capacidad del par de *primers* para amplificar las secuencias codificantes de mCherry y tD Tomato. Por último, el *primer* reverso para amplificar K14D9 fue diseñado sobre la secuencia 35::KaKDEL y se adicionó en el extremo 5' una secuencia de 20 nucleótidos correspondientes al extremo N-terminal (inverso complementario) de la cadena codificante de las PFs. Con éste *primer* y el Forward-PS se realizó un PCR *in silico* para verificar su funcionalidad y la continuidad del marco de lectura en el producto (figura anexa 1.3 y 3.3).

TABLA 4.1: *Primers* utilizados y características

Función del <i>primer</i>	Denominación	Características
Primer directo para la amplificación de K14D9	Forward-PS	Amplifica la secuencia con el PS e incorpora la secuencia CACC, diseñado para la construcción KaKDEL (Petruccelli y col., 2006).
Primer reverso para la amplificación de K14D9	Reverso-Fusión	Elimina el codón de stop, adiciona el <i>linker</i> y la secuencia que se superpone con las PFs.
Primer directo para la amplificación de la PF	Forward-PF	Amplifican la secuencia de ambas proteínas fluorescentes rojas con su codón de stop.
Primer reverso para la amplificación de la PF	Reverso-PF	

Habiendo verificado su funcionalidad *in silico*, se decidió utilizar los *primers* Forward-PS y Forward-PFs, con los que se contaba, y se adquirieron los *primers* verso-Fusión y Reverso-PFs diseñados (Tabla 4.1).

## 2. Construcción de la fusión kappa-PF

### 2.1 Primera etapa: amplificación de los genes a ser fusionados

En una primera etapa de PCR se debía amplificar las secuencias codificantes de PS-Kappa y las PFs. Para poner a punto las condiciones de reacción se utilizaron volúmenes de reacción de 15  $\mu$ l y la enzima DNA polimerasa *Taq* (Fermentas). La amplificación de PS-Kappa y mCherry no presentó problemas, dando un único producto con buenos niveles de amplificación, pero tD Tomato presentó un doblete de bandas al visualizar la corrida electroforética de la mezcla de reacción. Este resultado era esperable ya que la secuencia se encuentra repetida por tratarse de un dímero en tándem. Se purificaron los productos de PCR de los tamaños adecuados desde el gel de electroforesis para ser utilizados posteriormente en la PCR de fusión.

TABLA 4.2: Reacciones de PCR y los tamaños esperados

	PCR 1 (PS-Kappa)	PCR 2 (tDTomato)	PCR 3 (mCherry)	Fusión PS- Kappa-tDTomato	Fusión PS- Kappa-mCherry
Molde	pRTL202-35::KaKDEL <sup>a</sup>	pcDNA3-ER-tdT-Tomato <sup>b</sup>	pBIN20-ER-Cherry-ka <sup>c</sup>	Productos de las PCR 1 y PCR2	Productos de las PCR1 y PCR3
Primer directo	Forward-PS	Forward-PF	Forward-PF	Forward-PS	Forward-PS
Primer reverso	Reverso-Fusión	Reverso-PF	Reverso-PF	Reverso-PF	Reverso-PF
Tamaño (pbs)	697	1452	732	2107	1387

a) Petruccelli y col., 2006; b) Snapp y col., 2006; c) Nelson y col., 2007

## 2.2 Segunda etapa: PCR de fusión

Para poner a punto la PCR de fusión se utilizaron los productos de amplificación de PS-Kappa y tDTomato, y una vez establecidas las condiciones se llevo a cabo las PCR de fusión preparativas con la DNA polimerasa *Pfx*. Se decidió utilizar la secuencia de tDTomato porque con esta se obtiene el producto de fusión de mayor tamaño y se esperaba que muestre mayores inconvenientes que la secuencia de mCherry, teniendo en cuenta los inconvenientes del paso inicial de PCR (dos productos de amplificación).

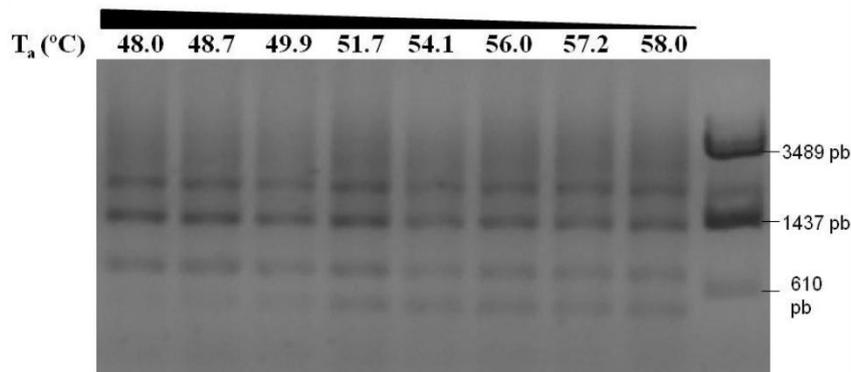
Se utilizaron dos estrategias de PCR de fusión:

1) Método de Megaprimer: el cual consiste en utilizar el primer producto de PCR como *primer*, junto con un *primer* más pequeño que hibridiza con la secuencia del gen que se desea hacer la fusión. El molde en este caso es la secuencia del segundo gen, estando el primero incluido en el *megaprimer*.

2) Overlap extension polymerase chain reaction (OE-PCR): en este caso el producto de la primera reacción de PCR, que contiene uno de los genes a fusionar y una secuencia que se solapa con el segundo gen, y el segundo gen son utilizados como molde. Los dos *primers* empleados son cortos y se ubican en los extremos de los genes a fusionar.

El método del *Megaprimer* no mostró bandas nítidas en el gel de electroforesis, de modo que se concluyó que la amplificación no era eficiente. Por lo que se descartó como método de fusión.

Empleando OE-PCR, se buscó optimizar la temperatura de *annealing* haciendo reacciones de PCR utilizando un gradiente de temperaturas de apareamiento de primers. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.2, donde puede observarse que en todos los casos fueron amplificados múltiples productos. Si bien en las reacciones donde se utilizaron las temperaturas de apareamiento más elevadas desaparece uno de los productos, el aumento de la temperatura de *annealing* no mostró mejorar la amplificación del producto de interés. Para solucionar este problema se ensayaron reacciones utilizando *hot-start*, esta técnica, en la cual se adiciona la DNA polimerasa luego de la etapa inicial de desnaturalización (4 minutos a 94°C), había mostrado disminuir la amplificación de productos inespecíficos en trabajos previos en nuestro grupo de investigación. El OE-PCR utilizando *hot-start*, permitió obtener solo dos bandas para la fusión PS-Kappa-tDTomato, una de ellas con el tamaño esperado (figura 4.3 B). La tabla 4.3 muestra los detalles de las condiciones, mezclas de reacción utilizadas y los resultados obtenidos en cada caso.



**Figura (4.2)** PCR de fusión de PS-Kappa a tDTomato, se realizó un gradiente de temperatura de *annealing* ensayando valores entre 48 y 58°C. Gel de agarosa al 1% p/V, en las calles 1 a 9 fueron sembrados los PCR con un patrón decreciente en las temperaturas de *annealing* y en la última calle fue sembrado el patrón de peso molecular, que consiste en la digestión del vector pMonAmh con *Hind III*.

TABLA 4.3: Estrategias de amplificación y resultados obtenidos

Estrategia	Condiciones de amplificación				Resultado
	Primer directo	Primer reverso	Molde/s	T <i>annealing</i>	
<b>Megaprimer</b>	PCR 1 (secuencia codificante de PS-Kappa)	Reverso-PF	PCR 2 (secuencia codificante de una de tDTomato)	55°C	No hubo amplificación
<b>OE-PCR</b>	<b>Gradiente de temperatura</b> Forward-PS	Reverso-PF	PCR 1 y PCR 2	48.0 °C 48.7 °C 49.9 °C 51.7 °C 54.1 °C 56.0 °C 57.2 °C 58.0 °C	Múltiples bandas en todas las temperaturas ensayadas (ver figura 4.6).
	<b>Hot-start</b> Forward-PS	Reverso-PF	PCR 1 y PCR 2	55°C	Se amplificaron dos bandas definidas. (ver figura 4.7)

Como el *hot-start* mostró mejorar marcadamente la amplificación, disminuyendo productos inespecíficos, se repitieron las PCR preparativas de PS-Kappa, mCherry y tDTomato utilizando también *hot-start* (figura 4.3A) De este modo pudo solucionarse completamente el problema del doblete de bandas para tDTomato. Una vez establecidas las condiciones de amplificación (tabla 4.3) se procedió a llevar a cabo la amplificación preparativa (50 µl de reacción) utilizando la enzima DNA polimerasa *Pfx* (Invitrogen) que posee actividad exonucleasa 3'-5' (*proofreading*), para disminuir las probabilidades de incorporar errores en las secuencias.

### 3. Clonado

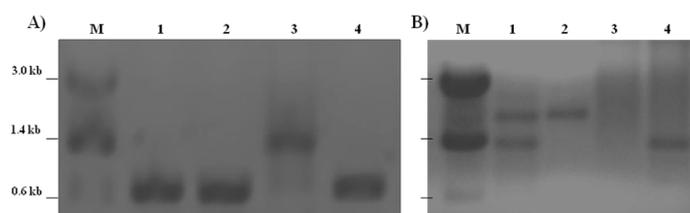
#### 3.1 Clonado en pENTR/TEV/D-TOPO. Reacción TOPO

Los productos frescos de OE-PCR purificados (no más dos horas post-amplificación) se sometieron a la reacción TOPO para ligar los insertos al vector de clonado pENTR/TEV/D-TOPO. Se modificó el protocolo recomendado para este kit de clonado, disminuyendo el volumen de reacción para economizar el vector y aumentando

el tiempo de incubación de 5 min a dos horas para mantener los rendimientos. La mezcla de reacción (almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ ), se utilizó posteriormente para la transformación por *shock* térmico de células competentes de *E.coli* DH5- $\alpha$ . El vector posee resistencia a kanamicina, por lo cual se sembró la transformación en placas de medio LB sólido con éste antibiótico (concentración final 50  $\mu\text{g/ml}$ ) para seleccionar las células que incorporaron el plásmido.

### 3.1.1 Screening de los clones obtenidos

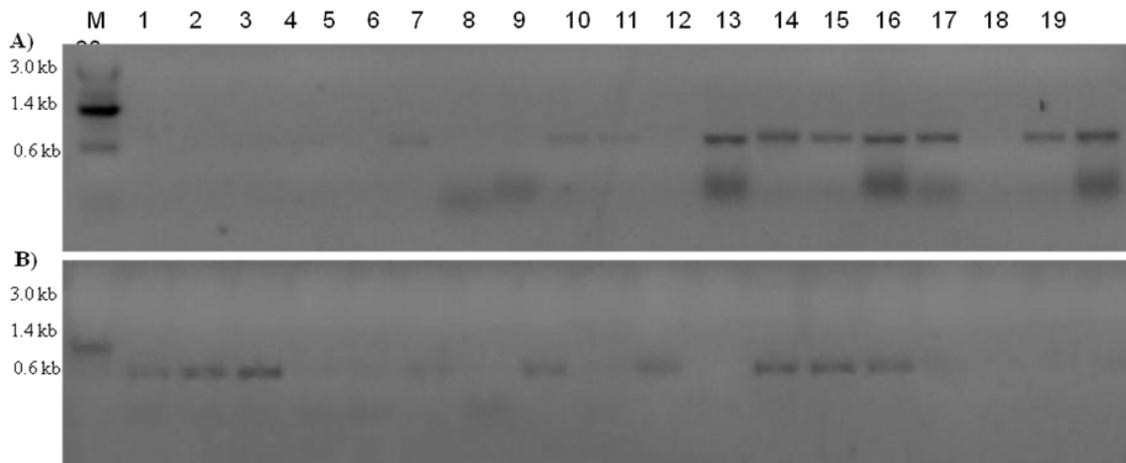
Las colonias obtenidas fueron sometidas a *screening* por *colony*-PCR, amplificando solo la secuencia PS-Kappa (*primers* Forward-PS x Reverso-Fusión) debido a que esta reacción de PCR requiere menores tiempos de incubación y no es necesario utilizar *hot-start*. Se observó que aproximadamente uno de cada dos clones es positivo (ver figura 4.4), verificando la alta eficiencia del sistema de clonado utilizado, y se encuentra además en la orientación adecuada ya que el clonado es direccional. La orientación fue verificada, para los clones positivos, mediante PCR utilizando el primer Forward-M13 y el primer Reverso-Fusión, siendo correcta en todos los clones positivos.



**Figura (4.3)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v. (A) Etapa inicial de amplificación por PCR utilizando *hotstart*. Calles (1) y (2), amplificación de la secuencia codificante de PS-Kappa; (3) tDTomato; (4) mCherry. (B) O-PCR utilizando *hotstart*. Calle (1) fusión PS-Kappa-tDTomato; (2) fusión PS-Kappa-tDTomato habiendo purificado la banda de interés; (3) control negativo; (4) fusión PS-Kappa-mCherry. En ambos casos la calle denominada M corresponde a la digestión del plásmido pMonAmh con *Hind III*, utilizada como patrón.

TABLA 4.4: Resumen de los resultados de la transformación y el *screening*.

Construcción	Nº de colonias obtenidas	Nº de colonias sometidas a screening	Nº de clones positivos
PS-Kappa-mCherry	35	19	8
PS-Kappa-tDTomato	27	18	10



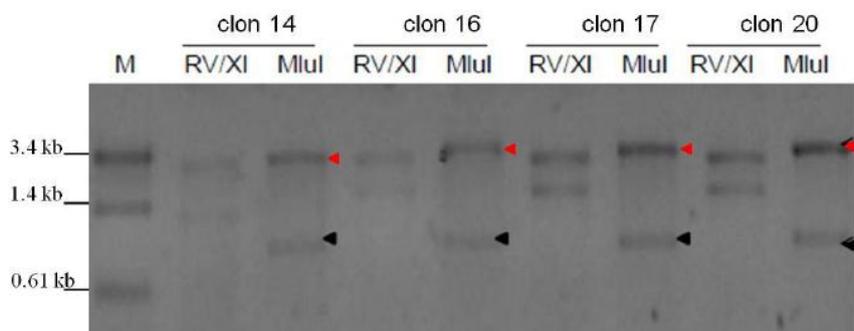
**Figura (4.4)** *Colony-PCR* de los clones obtenidos, luego de la reacción TOPO y transformación en *E.coli* DH5- $\alpha$ , para encontrar aquellos que incorporaron el inserto. Se amplificó con *primers* específicos para PS-Kappa que dan lugar a un fragmento de 697 pbs. La calle (M) corresponde, en ambos casos, al patrón de peso molecular, en el gel A) se sembró en la calle (1) el control negativo y en las calles (2-20) los clones ensayados para PS-Kappa-tD Tomato; en el gel B) se sembraron en las calles (1-20) los clones ensayados para PS-Kappa-mCherry.

### 3.1.2 Digestiones enzimáticas

De los clones positivos se tomaron 4 de cada construcción y se realizaron cultivos toda la noche en medio líquido LB con Kanamicina para hacer preparaciones plasmídicas. Las minipreps fueron sometidas a digestión enzimática con *Xho I/Eco RV* o con *Mlu I* (ver figura anexa 1.4), en el primer caso se verificará la liberación del inserto. Debido a que tanto el vector de clonado como el vector de expresión poseen resistencia a Kanamicina, la utilización del producto de digestión con *Mlu I* en lugar del clon de entrada en la reacción LR disminuye marcadamente el *background* introducido por el vector de clonado facilitando el posterior *screening*. La tabla 4.5 muestra los tamaños esperados para los fragmentos de digestión a modo de ejemplo se muestra el gel de electroforesis (figura 4.5) para las digestiones de los clones pENTR/TEV-PS-Kappa-tD Tomato, donde se observa que salvo el clon 14 todos los clones ensayados mostraron el patrón esperado. Se eligió uno de los clones para cada construcción para seguir trabajando, clon 14 para PS-Kappa-mCherry y clon 17 para PS-Kappa-tD tomato, que fueron los que mostraron el patrón de digestión esperado más limpio. En la figura anexa 1.4 se muestra un esquema con los insertos clonados en el vector de entrada, sus tamaños y los sitios de corte de las enzimas.

TABLA 4.5: Tamaños de los fragmentos de digestión esperados

Construcción clonada en pENTR/TEV/D-TOPO	Tamaño del vector (pbs)	Fragmentos de digestión con XhoI/EcoRV (pbs)	Fragmentos de digestión con MluI (pbs)
PS-Kappa-mCherry	3992	1546 (inserto) 2446 (vector)	3060 932
PS-Kappa-tDTomato	4713	2267 (inserto) 2446 (vector)	3781 932



**Figura (4.5)** Electroforesis en gel de agarosa 2% de las digestiones de los clones 14, 16, 17 y 20 con las enzimas *XhoI/EcoRV* o *MluI* para la fusión PS-Kappa-tDTomato. Se observa que todos los casos el patrón fue el esperado salvo para la digestión del clon 14 con *XhoI/EcoRV*, donde el patrón extraño pudo deberse a una mala preparación plasmídica. Las cabezas de flecha negra señalan el fragmento purificado del gel para someterlo a la reacción LR.

### 3.2 Clonado en el vector de expresión, pGWB2

Los fragmentos de digestión con *MluI* que contenían los insertos (para PS-Kappa-mCherry 3060 pbs y para Kappa-tDTomato de 3781 pbs), fueron purificados del gel de electroforesis y sometidos a la reacción LR con el vector pGWB2. El protocolo de reacción, al igual que en caso de la reacción TOPO, también difiere al recomendado por el fabricante. Los vectores fueron utilizados para transformar bacterias competentes químicas comerciales (*One Shot® Chemically Competent E. coli*, Invitrogen) y dado que el vector pGWB2 posee resistencia a kanamicina, se plaqueó la transformación en medio LB sólido con ese antibiótico.

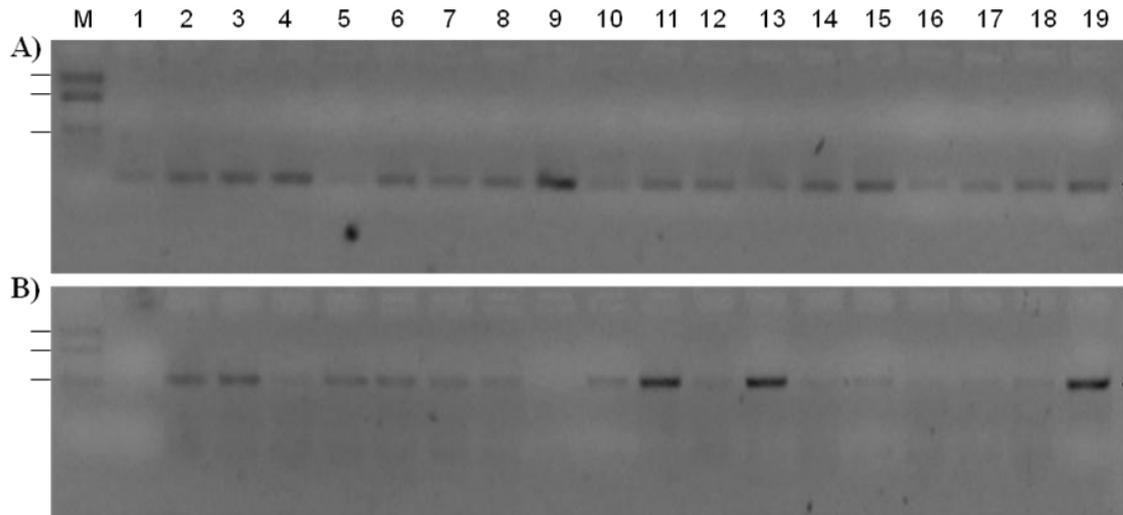
### 3.2.1 *Screening de los clones obtenidos*

Los clones resultantes fueron sometidos a *colony*-PCR para hallar aquellos que incorporaron el plásmido con el inserto. Se realizaron dos reacciones de PCR para cada clon:

- ✓ Amplificación de la secuencia del promotor CaMV 35S: para verificar la incorporación del vector.
- ✓ Amplificación de PS-Kappa: para determinar la presencia del inserto.

Se observó para ambas construcciones que prácticamente todos los clones eran positivos (para ambas reacciones), lo que refleja la elevada eficiencia del sistema utilizado para realizar el subclonado (4.6).

A continuación se seleccionaron dos clones (uno de cada construcción) de los cuales se recuperaron los plásmidos y se transformaron células electrocompetentes de *A. tumefaciens* GV3103. La transformación fue sembrada en placas con medio YEB sólido con Gentamicina (50 mg/ml), marcador de selección de la agrobacteria y Kanamicina (50 mg/ml) para seleccionar el vector pGW. Las placas se incubaron a 28°C en oscuridad toda la noche, y los clones obtenidos fueron sometidos a *screening* por *colony*-PCR, amplificando la secuencia codificante de PS-Kappa como en otras ocasiones. Se seleccionó un clon en GV3103 de cada construcción y se procedió a evaluar su funcionalidad.



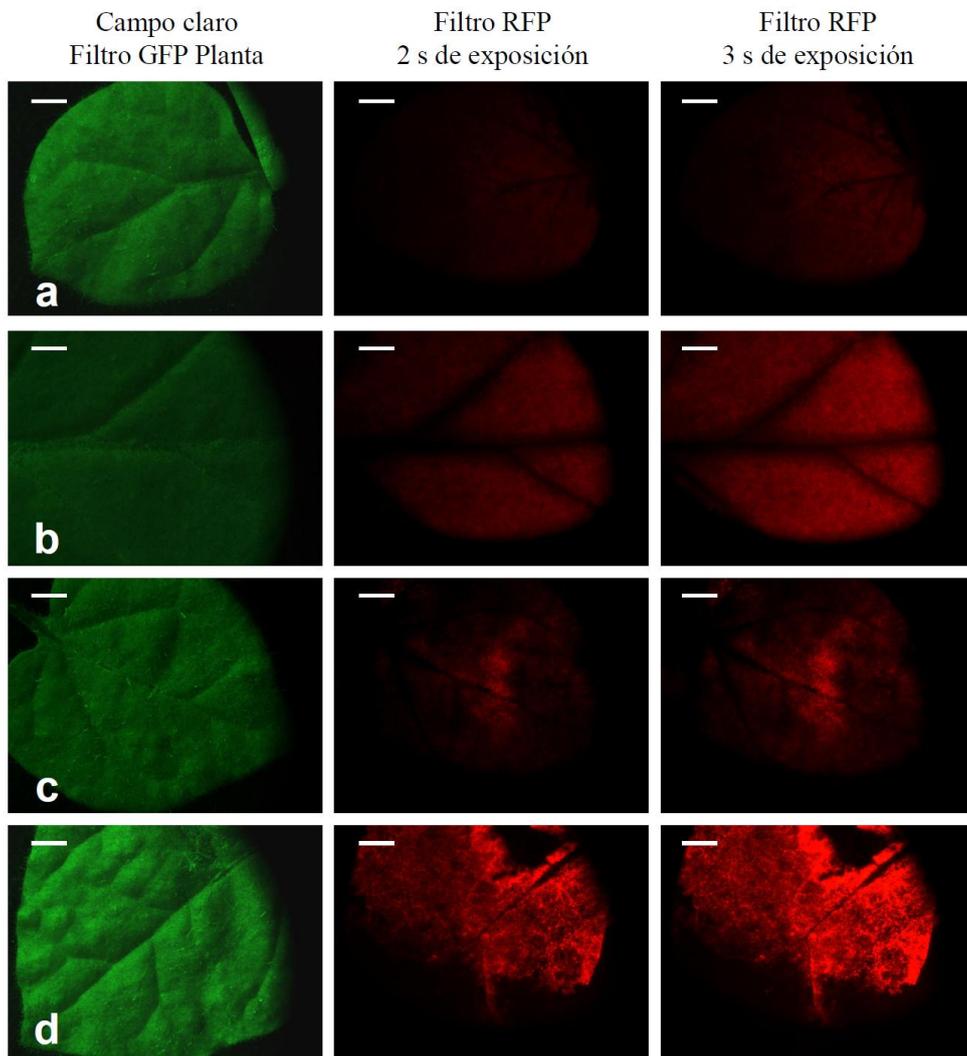
**Figura (4.6)** Electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v del *colony*-PCR para el *screening* de los clones transformados con la mezcla de reacción LR para la fusión PS-Kappa-mCherry. En la calle M de ambos geles se sembró el patrón. En el gel A) se muestra el *colony*-PCR amplificando la secuencia del promotor CaMV 35S, presente en el vector pGWB2, mientras que en el gel B) se amplificó PS-Kappa. Calles (1-18) clones ensayados; (19) control positivo de cada reacción, donde se utilizaron como moldes el vector pGWB2 vacío (en A) y el vector KaKDEL (en B).

#### 4. Evaluación de la funcionalidad de las construcciones obtenidas

##### *Ensayos de expresión transitoria en hojas de N. benthamiana y observación con un microscopio de disección fluorescente*

La agroinfiltración es, como se mencionó previamente, una herramienta sencilla que nos permite evaluar la expresión transitoria de construcciones, como un paso previo a la obtención de la planta transgénica (expresión estable). En principio se buscaba determinar si la proteína de interés estaba o no siendo expresada; para ello, dada la fusión a la proteína fluorescente, era suficiente con verificar fluorescencia en el tejido agroinfiltrado. Se llevo a cabo la infiltración mediada por *agrobacterium* de hojas de *N. benthamiana* y la observación de la muestras con microscopio de disección fluorescente LEICA MZ10F 72 hs post-agroinfiltración.

De esta manera, se verificó que ambas construcciones eran expresadas en plantas ya que, como se observa en la figura 4.7, las hojas agroinfiltradas con las construcciones PS-Kappa-mCherry y PS-Kappa-tDTomato muestran una fluorescencia que supera ampliamente a la autofluorescencia del tejido vegetal. También se puede verificar en este experimento que, como se esperaba, la brillantez de la proteína tDTomato es claramente mayor que mCherry (asumiendo iguales niveles de expresión, dado que fueron clonadas en el mismo vector y se usaron condiciones equivalentes en la agroinfiltración).

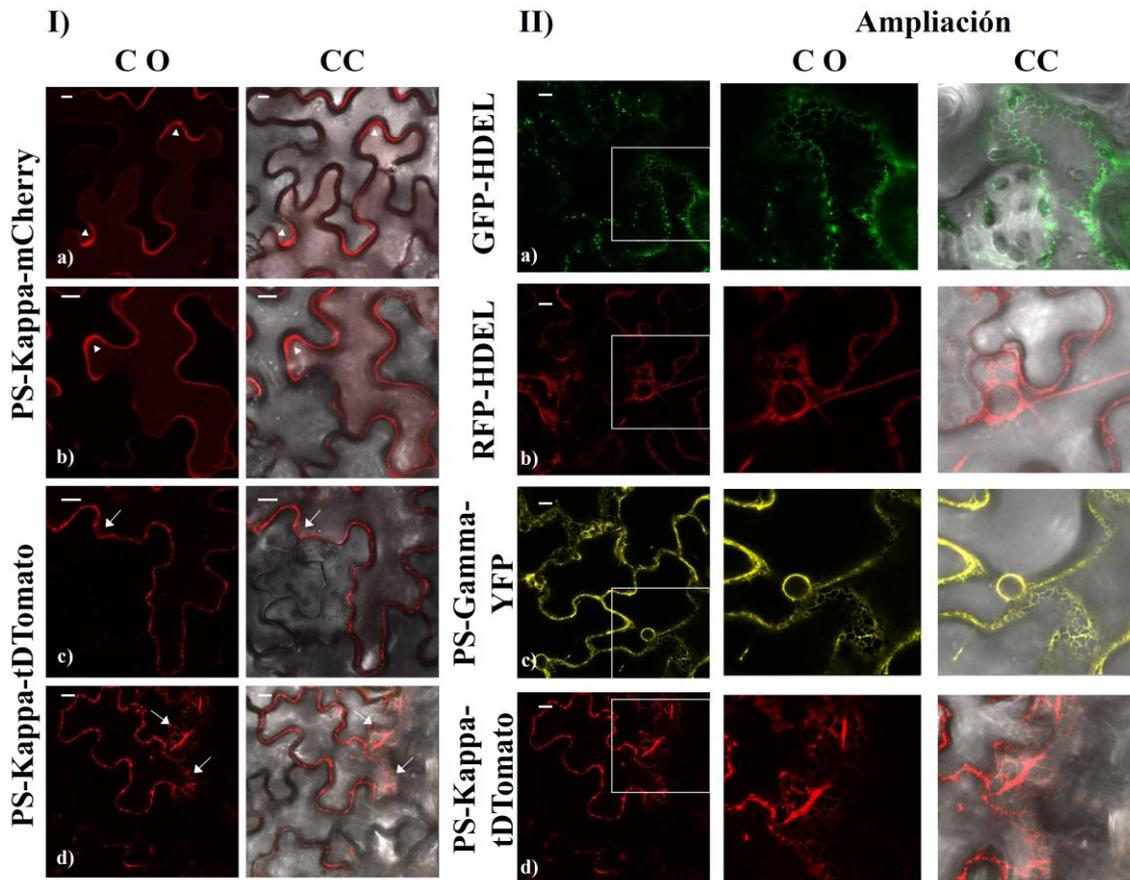


**Figura (4.7) Evaluación de la funcionalidad de las construcciones.** Ensayos de expresión transitoria mediante la técnica agroinfiltración de hoja, en *N. benthamiana* y observación de fluorescencia en Lupa UV (Leica MZ10F) tres días post-infiltración.: (a) Hoja infiltrada con MI 1X (control negativo, autofluorescencia); (b) se agroinfiltró con la construcción RE-Cherry (control positivo); (c) hoja agroinfiltrada con la construcción PS-Kappa-Cherry y (d) hoja que fue agroinfiltrada con la construcción PS-Kappa-tDTomato. Escala de barra 2.00 mm. Como puede observarse los paneles con filtro rojo permiten confirmar la funcionalidad de las construcciones y la comparación entre ellos muestra que la proteína de fusión Kappa-tDTomate es más brillante que Kappa-Cherry.

### **5. Localización subcelular de las *Kappa-mCherry* y *Kappa-tD*Tomato en células de epidermis de *N. benthamiana***

Para poder estudiar el direccionamiento subcelular, fue necesaria la utilización de un microscopio de fluorescencia confocal. Hojas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con cultivos bacterianos a DO600 de 0.1, ya que cultivos más concentrados dan lugar a la saturación del sistema de secreción, lo que impide determinar fidedignamente la localización final real de la proteína de estudio. Siguiendo estas condiciones se llevaron a cabo ensayos de expresión temporal para las dos construcciones obtenidas en este trabajo. Los resultados se presentan en la figura 4.8, según se describe a continuación:

- ✓ En el caso de la construcción PS-Kappa-mCherry, todas las células transformadas presentaban el mismo patrón. La fluorescencia se encontró localizada en el contorno celular pudiendo este patrón corresponder tanto a apoplasto como membrana plasmática. Sin embargo, las proteínas de membrana presentan un patrón homogéneo a lo largo de toda la extensión celular, mientras que en los patrones típicos de apoplasto se observan engrosamientos en determinadas zonas (ver figura 4.8 parte I) a y b, cabezas de flechas). Este patrón, observado para la acumulación de Kappa-mCherry, es típico de las proteínas secretadas al apoplasto (ej: Scabone y col., en revisión). En base a estos resultados podemos afirmar que esta construcción se expresa correctamente en plantas y la proteína de fusión es secretada. Dado que una proteína mal plegada no supera los mecanismos de control de calidad queda retenida en RE o es exportada al citoplasma para degradación por el proteosoma, se propone que Kappa-mCherry ha superado los mecanismos de control de calidad. En la figura 4.8 parte I), se observa una fluorescencia débil en el interior celular (superior a la observada en hojas no agroinfiltradas en las mismas condiciones de excitación, ver campo claro), lo que correspondería a la presencia de la proteína de fusión también en la vacuola central.

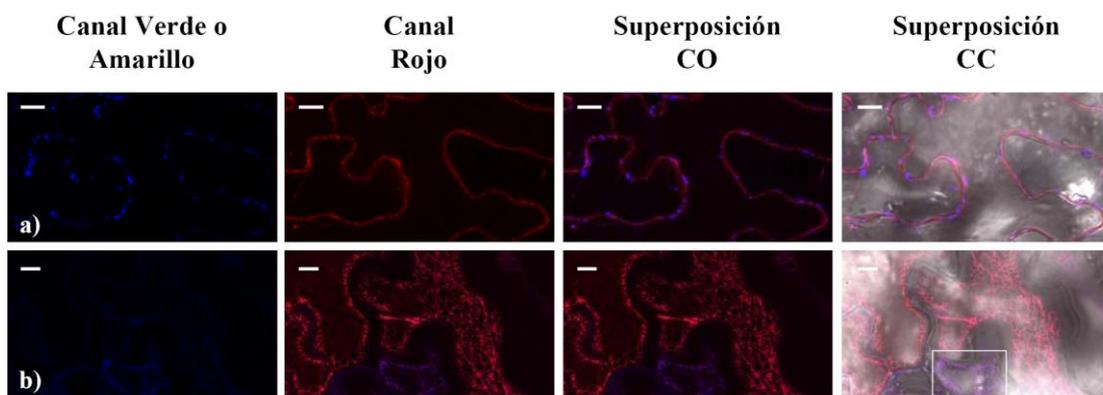


**Figura (4.8).** Ensayos de expresión transitoria mediante la técnica agroinfiltración de hoja y observación al microscopio confocal de fluorescencia (LeicaTCSSP5) 72 hs. post-infiltración. Parámetros: 63X. Escala de barra 10  $\mu$ m.

**Parte I) *Localización subcelular en células de la epidermis de *N. benthamiana*.*** Micrografías típicas obtenidas para hojas agroinfiltradas con PS-Kappa-Cherry (paneles (a) y (b)) donde se observan engrosamientos en algunos sectores (cabezas de flecha) un patrón típico de apoplasto por que podríamos asumir que Kappa-Cherry es secretada, en el campo claro (CC) se puede observar también fluorescencia en la vacuola central. En el caso de la construcción PS-Kappa-tDTomato (paneles (c) y (d)) se observa un patrón típico de retículo endoplásmico (flechas), visible en la sección óptica a través del citoplasmática cortical que se encuentre inmediatamente adyacente a otras paredes celulares periclinares, por lo que podríamos asumir Kappa-tDTomato es retenida en este compartimento subcelular, al observar el campo claro no se observa fluorescencia en la vacuola.

**Parte II) *Patrones de fluorescencia para proteínas de acumulación en RE.*** Se utilizaron las construcciones GFP-HDEL (Haseloff y col., 1997) y RFP-HDEL (Nelson y col., 2007) que poseen una señal de retención en RE, en las micrografías (paneles (a) y (b) respectivamente) se observa claramente el patrón característico de retículo tanto en la ampliación en CO (campo oscuro) como en CC. En las micrografías correspondientes a PS-Kappa-tDTomato (d) y PS-Gamma-YFP (c) se pudo observar que el patrón de acumulación concuerda con el mostrado por los marcadores de RE. Una sección ampliada (recuadro en blanco) de la imagen original se muestra en los paneles de la derecha.

- ✓ La construcción PSKappa-tDTomato, presentó un patrón de acumulación diferente al anterior: si bien la fluorescencia se observada en el contorno celular, mostraba zonas puntuales más fuertes que es un patrón típico de (aparato de Golgi o compartimentos prevacuolares) y en algunos sectores, en los cuales la sección óptica no correspondía al centro celular, se observaba una especie de red de fluorescencia roja (ver figura 4.8 parte I c) y d), flechas). Este patrón fue observado también al agroinfiltrar con la construcción PS- $\gamma$ -YFP (PS-gamma14D9-YFP) y, al comparar con trabajos previos (ej: Batoko y col., 2004), pudo identificarse como un patrón típico de RE. Por lo tanto, esta proteína de fusión en lugar de ser secretada está siendo retenida en RE. Es evidente que la proteína fluorescente dimérica interfiere en el direccionamiento de K14D9, este fenómeno no se observó en fusiones a mCherry. La diferencia entre ambas proteínas de fusión podría atribuirse a que tDTomato afecta el correcto plegado de la cadena liviana del anticuerpo o bien que la agregación de tDTomato está impidiendo su transporte posterior en la vía secretoria.



**Figura (4.9)** *Co-agroinfiltración de hojas de N. benthamiana* con PS-Kappa-tDtomato y el marcador de RE GFP-HDEL (Haseloff y col., 1997) o con PS-Gamma-YFP y el marcador RFP-HDEL (Nelson y col., 2007), paneles (a) y (b) respectivamente, para confirmar los patrones observados. Puede verse en (a), que las dos proteínas se encontrarían en la misma localización subcelular, RE. La diferencia entre los patrones de acumulación (puntos de elevada fluorescencia mostrados por GFP-HDEL) indicaría la ubicación en distintas estructuras del RE. En el panel (b) se observa una superposición completa de la fluorescencia, en la célula que incorporó ambas construcciones (recuadro, Superposición CC). Para poder visualizar mejor la superposición los canales verde y amarillo correspondientes a GFP o YFP, se muestran en azul.

## ***6. Localización subcelular de las Kappa-mCherry y Kappa- tD Tomato en presencia de Gamma-YFP***

Para determinar si las proteínas de fusión obtenidas en este trabajo eran capaces de ensamblarse con la gamma para formar la inmunoglobulina, se procedió a expresarlas en presencia de la cadena pesada del mismo anticuerpo. Estudios previos de expresión de genes de inmunoglobulinas en distintos sistemas han mostrado que la cadena pesada no logra una estructura correcta en ausencia de la cadena liviana, adquiriendo una estructura tridimensional correcta solo los dominios variables, CH2 y CH3, quedando el CH1 sin plegar por lo que se une a BiP y no puede ser secretada. En cambio la cadena liviana en ausencia de la pesada se pliega y es secretada. Como se mencionó previamente, al inicio de este proyecto estaba disponible la construcción gamma14D9-YFP (PS- $\gamma$ -YFP) y se habían obtenidos plantas transgénicas de *A.thaliana* que la expresaban de manera estable (Mangano, resultados no publicados). Antes proceder a evaluar la expresión de la inmunoglobulina completa se analizó el patrón de acumulación de la proteína de fusión Gamma-YFP mediante ensayos de expresión transitoria. Como se observa en la figura 4.8 Parte II ) el patrón obtenido en este caso es similar al observado para Kappa-tD Tomato, tratándose claramente de un patrón de acumulación en RE similar al observado con las proteínas reporteras GFP-HDEL (Haseloff y col., 1997) y RFP-HDEL (Nelson y col., 2007). Estas proteínas poseen un señal de retención en retículo endoplasmático y son utilizadas como marcadores de dicho compartimento subcelular. Los ensayos de co-localización con patrones de fluorescencia, son comúnmente utilizados para confirmar la localización subcelular de una proteína de interés. En este caso, para confirmar los patrones de acumulación en retículo se llevaron a cabo ensayos de co-agroinfiltración, en los cuales junto con la agrobacteria que posee la construcción PS-Kappa-tD Tomato se utilizó una llevando el marcador GFP-HDEL (Haseloff y col., 1997) y en el caso de PS-Gamma-YFP, portando el marcador RFP-HDEL (Nelson y col., 2007) (para evitar cualquier tipo de solapamientos que pudiera ocurrir entre los espectros de excitación/emisión entre YFP y GFP). Dado que tanto PS-Kappa-tD Tomato como PS-Gamma-YFP muestran un patrón típico de retículo (figura (4.8 II)) se esperaba observar co-localización con los marcadores mencionados. En la figura 4.9 a), al superponer ambos canales, se observa que el patrón de GFP-HDEL resultó ser ligeramente diferente al de PS-Kappa-

tDTomato, GFP muestra un patrón punteado muy marcado donde aparentemente no hay fluorescencia roja. Las micrografías mostradas corresponde al patrón más representativo obtenido para estas construcciones. El hecho de que el patrón de Kappa-tDTomato y GFP-HDEL sea diferente implicaría que las mismas se localizan en distintas regiones funcionales del RE (Sparkes y col., 2009) lo que podría indicar la presencia tanto de distintos dominios estructurales involucrados en la síntesis de estas proteínas, como así también diferencias en etapas postraduccionales, ya que por ejemplo GFP-HDEL recicla entre el RE y Golgi. En el caso de Gamma-YFP se observó superposición completa de la fluorescencia amarilla con la roja del marcador RFP-HDEL (ver recuadro, figura 4.9 b).

Con la finalidad de estudiar la expresión conjunta de las cadenas ambas cadenas del anticuerpo, se llevaron a cabo los siguientes ensayos:

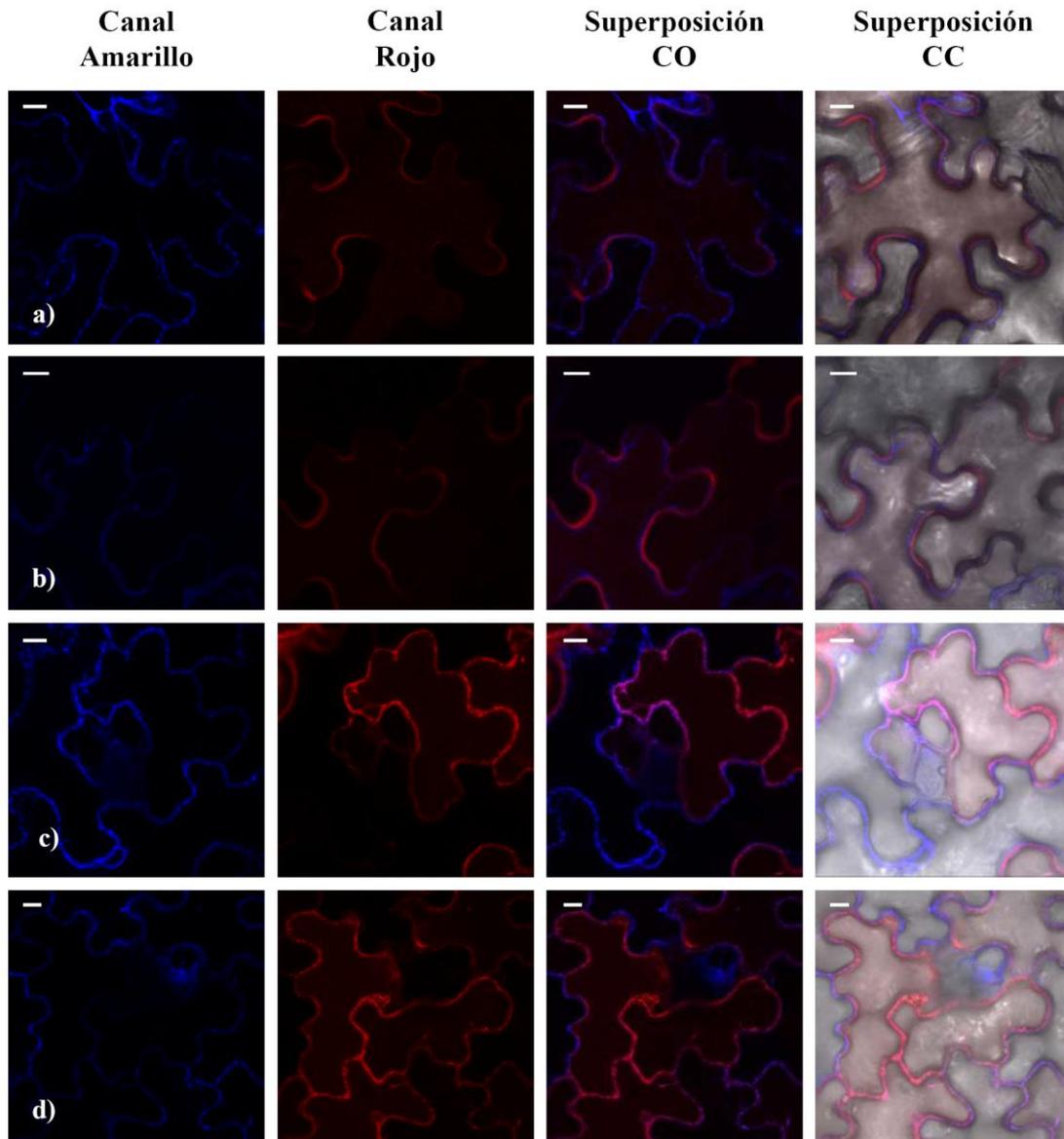
- Co-agroinfiltraciones de PS-Kappa-RFP y PS- $\gamma$ -YFP en hojas de *N.benthamiana*
- Agroinfiltraciones de PS-Kappa-RFP en hojas de plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan  $\gamma$ -YFP

### ***6.1. Localización subcelular en hojas de *Nicotiana benthamiana****

En este caso se utilizaron co-cultivos en relación 1:1, las células que incorporaron ambas construcciones presentan tanto fluorescencia roja como amarilla. Las imágenes de microscopía de fluorescencia confocal muestran que:

- ✓ En el caso de la expresión de Kappa-mCherry y  $\gamma$ -YFP, los patrones de localización que se observan en los canales amarillo y rojo son claramente diferentes (ver panel superior, figura 4.11), manteniendo Kappa-mCherry un patrón típico de apoplasto y  $\gamma$ -YFP uno de RE, coincidente con lo observado al expresarlas por separado. Al superponer ambos canales no se observa fluorescencia naranja (en la figura el canal amarillo esta representado en azul y, por lo tanto la co-localización debería ser violeta) por lo que no habría co-localización siendo este el patrón que predomina.
- ✓ La ausencia de fluorescencia amarilla en el apoplasto podría atribuirse tanto a

que a que el anticuerpo no se ensambla, o si se ensambla no puede secretarse o bien podría ser que la YFP no es estable en el apoplasto. Al observar células que expresan Kappa-tDTomato y  $\gamma$ -YFP podemos resaltar: que se mantuvieron los patrones reticulares presentados en la expresión de las proteínas por separado y la localización de fluorescencia mostrada en los campos amarillo y rojo aparentemente coincide, ya que en la superposición de los campos donde solo se observa un patrón naranja en toda la extensión celular. Este resultado es distinto al obtenido al superponer Kappa-tDTomato con GFP-HDEL, donde se observa escasa co-localización. En síntesis podemos decir que ambas proteínas se fusión están localizadas en RE y que se trataría de las mismas estructuras reticulares. Los patrones de retículo utilizados tienen la misma señal de retención (HDEL) pero poseen distinto PS, GFP-HDEL contiene el péptido señal N-terminal de la quitinasa vacuolar básica de *Arabidopsis* y RFP-HDEL el de AtWAK2 (*Arabidopsis thaliana* wall-associated kinase 2) (He y col., 1999; Nelson y col., 2007)

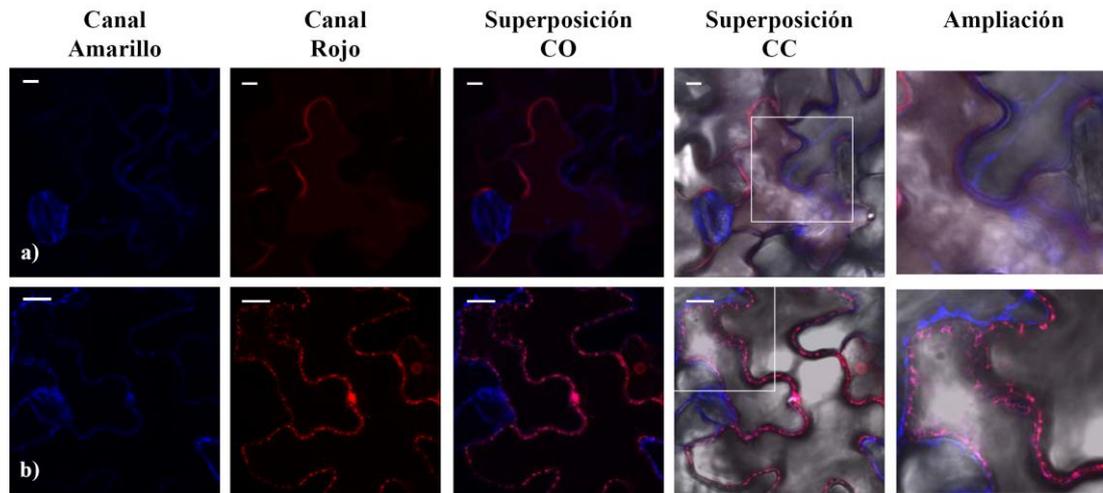


**Figura (4.10)** *Co-agroinfiltración de hojas de N. benthamiana.* Se co-agroinfiltraron las construcciones obtenidas con la constricción PS- $\gamma$ -YFP. En el panel superior, en el canal RFP, puede observarse que aparentemente el destino final de Kappa-mCherry sigue siendo el apoplasto mientras que  $\gamma$ -YFP está siendo retenida en el RE; al superponer los paneles no vemos co-localización de las proteínas. En el panel inferior, podemos ver que el destino final de Kappa-tDTomato tampoco se ha visto modificado por la presencia de la cadena  $\gamma$ -YFP, en este caso al superponer los paneles observamos que las proteínas co-localizan en RE. Parámetros: 63X. Escala de barra 10  $\mu$ m.

## ***6.2. Localización subcelular en hojas de Arabidopsis thaliana que expresan en forma estable Gamma-YFP***

Para determinar si hay alguna diferencia en lo observado al expresar ambas cadenas cuando la expresión de  $\gamma$ -YFP es estable, se agroinfiltraron hojas de plantas transgénicas de *Arabidopsis* con las construcciones desarrolladas. El objetivo de estos ensayos fue descartar la hipótesis de saturación debido a la sobrecarga de la maquinaria de síntesis y secreción, que puede alterar el destino de proteínas. Los resultados obtenidos en este caso fueron coincidentes con lo observado en los ensayos de expresión temporal de *N.benthamiana* observándose un patrón típico de retículo para Kappa-tD Tomato y  $\gamma$ -YFP y predominantemente de apoplasto para Kappa-mCherry. Sin embargo, en algunos cortes se observó que Kappa-mCherry presentaba un patrón reticular superponiéndose en estos casos con  $\gamma$ -YFP (figura 4.12 (a), ampliación). Este patrón reticulado para Kappa-mCherry no fue observado cuando esta construcción era expresada en ausencia de  $\gamma$ -YFP, lo que sugeriría una interacción entre ambas cadenas, resultado que debe ser confirmado.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que no ocurre secreción de la inmunoglobulina 14D9 completa marcada con dos proteínas fluorescentes y son coincidentes con los resultados informados para la expresión del anticuerpo monoclonal 2G12 específico contra el virus HIV en tabaco (Irons y col., 2008). En el caso del mAb2G12 la cadena pesada-Venus muestra una localización de retículo endoplásmico, sin embargo la cadena liviana del 2G12 muestra un patrón post-Golgi además de secreción. En el trabajo de Irons y col., (2008) la coexpresión de ambas cadenas del 2G12 presenta un patrón diferente del obtenido para las cadenas expresadas en forma separada, co-localizando ambas cadenas en estructuras puntuadas que estarían en estrecha asociación con el RE y se solapan con marcadores de compartimentos prevacuolares (GFP-RabF2b). En este trabajo mostramos que Kappa-mCherry es mayoritariamente secretada, aún en presencia de  $\gamma$ -YFP y en este último caso se observa en una fracción minoritaria un patrón reticulado que indicaría una interacción entre ambas cadenas de inmunoglobulina. Este resultado que debe confirmarse.



**Figura (4.11)** *Agroinfiltración de plantas transgénicas de A. thaliana que expresan  $\gamma$ -YFP.* En el panel (a) se muestran las micrografías obtenidas para la construcción PS-Kappa -mCherry, y en el panel (b) las correspondientes a PS-Kappa-tD Tomato. En el canal amarillo (mostrados en azul) se observa un patrón de RE correspondiente  $\gamma$ -YFP, en el canal rojo puede observarse que Kappa-mCherry es secretada y también aparece en vacuolas, en cambio Kappa-tD Tomato se encuentra en el RE. En células que expresan ambas construcciones mostradas con el recuadro, ampliándose la zona de interés, se observa el color violeta que muestra colocalización en el RE tanto Kappa -mCherry-  $\gamma$ -YFP como de Kappa-tD Tomato-  $\gamma$ -YFP. Parámetros: 63X. Escala de barra 10  $\mu$ m.

**CAPÍTULO V:**  
***CONCLUSIÓN***  
***GENERAL Y***  
***PERSPECTIVAS***

## **CAPÍTULO V: CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS**

### ***Conclusión general***

En este trabajo se diseñó una estrategia para fusionar la cadena liviana del anticuerpo 14D9 a genes reporteros rojos a fin de desarrollar un sistema que permita estudiar la síntesis de inmunoglobulinas completas en plantas. Se obtuvieron dos construcciones PS-Kappa-mCherry y PS-Kappa-TdTomato, que resultaron funcionales en ensayos de expresión transitoria. La fusión Kappa-mCherry fue secretada mientras que Kappa-tDTomato mostró un patrón predominante típico de RE. Estos resultados indican que la fusión a la proteína monomérica mCherry no altera la localización subcelular de la cadena liviana de inmunoglobulina; en cambio la fusión a la proteína dimérica modifica su destino subcelular. En base a estos resultados concluimos que la proteína dimérica no sería adecuada para los objetivos perseguidos. La Gamma-YFP fue observada en el retículo endoplásmico.

En los estudios de co-expresión de Kappa-mCherry y Gamma-YFP se observó que la cadena liviana mayoritariamente era secretada. En aquellas células en que se observaba expresión de ambas construcciones, se encontró además un patrón reticulado lo que sugiere que Kappa-mCherry sería parcialmente retenida en el RE. Este patrón reticular no había sido observado para la expresión de Kappa-mCherry, en ausencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina, lo que sugeriría una interacción entre estas proteínas, resultado que debe ser confirmado.

Se esperaba una secreción de la inmunoglobulina fusionada a ambos marcadores este resultado no fue obtenido, aunque se obtuvieron indicios de interacción entre ambas cadenas de anticuerpo. Este resultado podría ser una indicación de que el anticuerpo no se pliega correctamente (tal vez por interferencia causada por las PF) o bien que la inmunoglobulina fusionada a ambas PF no puede avanzar en la vía secretoria (tal vez como consecuencia de agregación).

### *Perspectivas*

A fin de explorar las razones por las que la inmunoglobulina completa fusionada a ambas FP no es secretada y determinar la localización subcelular se plantea evaluar:

- ❖ Ensamblado del anticuerpo: empleando métodos bioquímicos, inmunoprecipitaciones seguidas de *immunoblot* y/o ELISA.
- ❖ Interacción de la inmunoglobulina con BiP: a fin de ver si la interacción con esta chaperona determina su retención.
- ❖ Secreción de la inmunoglobulina fusionada sólo a una FP. Se agro infiltrará mCherry en plantas transgénicas que expresan gamma sin fusión a fin de evaluar si se observa la retención de mCherry en el RE. Se evaluarán además otras combinaciones empleando también fusiones de gamma-RFP ya que esta FP es más estable al pH del apoplasto.
- ❖ Localización subcelular de las proteínas de fusión: mediante ensayos de co-expresión expresión de PS-Kappa-tD Tomato con marcadores de Golgi y compartimientos prevacuolales para determinar si el punteado observado (además del patrón de RE mayoritario) corresponde a un patrón de Golgi o post-Golgi). Para Kappa-mCherry se plantea, previo a la observación al microscopio, plasmolizar las células para analizar si la fluorescencia en el contorno celular se debe a localización en apoplasto o membrana plasmática.

## ***Bibliografía***

***Bibliografía***

- Abranches R, Marcel, S., Arcalis, E., Altmann, F., Fevereiro, P., Stoger, E., (2005) Plants as bioreactors: A comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. *Journal of Biotechnology* **120**:121-134.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P (2008) *Molecular Biology of the Cell* (2008). *New York: Garland Science*.
- Bakker H, Bardor M, Molthoff JW, Gomord Vr, Elbers I, Stevens LH, Jordi W, Lommen A, Faye Lc, Lerouge P and Bosch D (2001) Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:2899-2904.
- Bakker H, Rouwendal GJA, Karnoup AS, Florack DEA, Stoopen GM, Helsper JPF, Van Ree R, Van Die I and Bosch D (2006) An antibody produced in tobacco expressing a hybrid alpha-1,4-galactosyltransferase is essentially devoid of plant carbohydrate epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:7577-7582.
- Barta A, BSommergruber K, Thompson D, Harmuth K, Matzke MA and Matzke JM (1986) The expression of nopaline synthase-human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology* **6**:347-357.
- Bethke PC and Jones RL (2000) Vacuoles and prevacuolar compartments. *Current Opinion in Plant Biology* **3**:469-475.
- Bhat SR and Srinivasan S (2002) Molecular and genetic analyses of transgenic plants: Considerations and approaches. *Plant Science* **163**:673-681.
- Birnboim H and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* **7**:1513.
- Brekke OH and Sandie I (2003) Therapeutic antibodies for human disease at the dawn of the twenty-first century. *Nature* **2**:52-61.
- Butaye KMJ, Goderis IJWM, Wouters PFJ, Poes JMTG, Delauré SL, Broekaert WF, Depicker A, Cammue BPA and De Bolle MFC (2004) Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. *The Plant Journal* **39**:440-449.
- Cabanes-Macheteau M, Fitchette-Lainé A-C, Loutelier-Bourhis C, Lange C, Vine ND,

- Ma JKC, Lerouge P and Faye L (1999) N-Glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants. *Glycobiology* **9**:365-372.
- Carla Famá M, Raden D, Zacchi N, Lemos DR, Robinson AS and Silberstein S (2007) The *Saccharomyces cerevisiae* YFR041C/ERJ5 gene encoding a type I membrane protein with a J domain is required to preserve the folding capacity of the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1773**:232-242.
- Colvin RB and Preffer FI (1991) Laboratory monitoring of therapy with OKT3 and other murine monoclonal antibodies. *Clin Lab Med* **11**:693-714.
- Conrad U and Fiedler U (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Molecular Biology* **38**:101-109.
- Cox KM, Sterling JD, Regan JT, Gasdaska JR, Frantz KK, Peele CG, Black A, Passmore D, Moldovan-Loomis C, Srinivasan M, Cuisson S, Cardarelli PM and Dickey LF (2006) Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nat Biotech* **24**:1591-1597.
- Chadd HE and Chamow SM (2001) Therapeutic antibody expression technology. *Current Opinion in Biotechnology* **12**:188-194.
- Chan M-T and Yu S-M (1998) The 3' untranslated region of a rice alpha-amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:6543-6547.
- Chen T-L, Lin Y-L, Lee Y-L, Yang N-S and Chan M-T (2004) Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures. *Transgenic Research* **13**:499-510.
- De Marco A (2009) Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **8**:26-29.
- Denecke J, Botterman J and Deblaere R (1990) Protein Secretion in Plant Cells Can Occur via a Default Pathway. *Plant Cell* **2**:51-59.
- Dinnis DM and James DC (2005) Engineering mammalian cell factories for improved recombinant monoclonal antibody production: lessons from nature? *Biotechnology and Bioengineering* **91**:180-189.
- Early P, Rogers J, M. D, K. C, M. B, R. W and L. H (1980) Two mRNAs can be

- produced from a single immunoglobulin  $\mu$  gene by alternative RNA processing pathways. *Cell* **20**:313-319.
- Edelman GM (1991) Antibody and molecular immunology. *Scandinavian Journal of Immunology* **34**:4-22.
- Elbers IJW, Stoopen GM, Bakker H, Stevens LH, Bardor M, Molthoff JW, Jordi WJRM, Bosch D and Lommen A (2001) Influence of Growth Conditions and Developmental Stage on N-Glycan Heterogeneity of Transgenic Immunoglobulin G and Endogenous Proteins in Tobacco Leaves. *Plant Physiol* **126**:1314-1322.
- Faye L and Gomord V Success stories in molecular farming—a brief overview. *Plant Biotechnology Journal* **8**:525-528.
- Faye L and Gomord V (eds) (2009) *Recombinant Proteins From Plants*: Humana Press.
- Faye L and Gomord V (2010) Success stories in molecular farming—a brief overview. *Plant Biotechnology Journal* **8**:525-528.
- Fink AL (1999) Chaperone-Mediated Protein Folding. *Physiol Rev* **79**:425-449.
- Fischer U, Kuhlmann M, Pecinka A, Schmidt R and Mette MF (2008) Local DNA features affect RNA-directed transcriptional gene silencing and DNA methylation. *The Plant Journal* **53**:1-10.
- Frigerio L, Vine ND, Pedrazzini E, Hein MB, Wang F, Ma JK-C and Vitale A (2000) Assembly, Secretion, and Vacuolar Delivery of a Hybrid Immunoglobulin in Plants. *Plant Physiol* **123**:1483-1494.
- Gasser B, Sauer M, Maurer M, Stadlmayr G and Mattanovich D (2007) Transcriptomics-Based Identification of Novel Factors Enhancing Heterologous Protein Secretion in Yeasts. *Appl Environ Microbiol* **73**:6499-6507.
- Gerstein M, Lesk AM and Chothia C (1994) Structural mechanisms for domain movements in proteins. *Biochemistry* **33**:6739-6749.
- Giddings G (2001) Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology* **12**:450-454.
- Gleba Y, Klimyuk V and Marillonnet S (2007) Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **18**:134-141.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA and Kuby J (eds) (2002) *Immunology fifth edition*
- Goldstein DA and Thomas JA (2004) Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM* **97**:705-716.

- Gomord V and Faye L (2004) Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **7**:171-181.
- Gomord V, Fitchette A-C, Menu-Bouaouiche L, Saint-Jore-Dupas C, Plasson C, Michaud D and Faye L (2010) Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal* **8**:564-587.
- Gomord V, Sourrouille C, Fitchette A, Bardor M, Pagny S, Lerouge P and Faye L (2004) Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnology Journal* **2**:83-100.
- Green LL, Hardy MC, Maynard-Curie CE, Tsuda H, Louie, D.M., Mendez MJ, Noguchi M, Smith DH, Zeng Y and et al. (1994) Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* **7**:13-21.
- Hanton S and Brandizzi F (2006) Protein transport in the plant secretory pathway. *Botany* **84**:523-530.
- Hartley JL, Temple GF and Brasch A (2000) DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research* **10**:1788-1795.
- Haseloff J and Amos B (1995) GFP in plants. *Trends in Genetic* **11**:328-329.
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC and Hodge S (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:2122-2127.
- He Z-H, Cheeseman I, He D and Kohorn B (1999) A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, Wak1-5, are expressed in specific organs of Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **39**:1189-1196.
- Heckman KL and Pease LR (2007) Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protocols* **2**:924-932.
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM and Fischer R (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotech* **22**:1415-1422.
- Herman EM and Larkins BA (1999) Protein Storage Bodies and Vacuoles. *Plant Cell* **11**:601-614.
- Hiatt A, Cafferkey R and Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342**:76-78.

- Hill CR (1990) Large-scale manufacture of monoclonal antibodies for use in humans. *Biochemical Society Transactions* **18**:245-247.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK and Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-59.
- Hoh B, Hinz G, Jeong B and Robinson D (1995) Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. *Journal of cell science* **108**:299.
- Hood E, Kusnadi A, Nikolov Z and Howard J (1999) Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize. *Chemicals via higher plant bioengineering*:127-148.
- Horn ME, Woodard SL and Howard JA (2004) Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Reports* **22**:711-720.
- Houston NL, Fan C, Xiang Q-Y, Schulze J-M, Jung R and Boston RS (2005) Phylogenetic Analyses Identify 10 Classes of the Protein Disulfide Isomerase Family in Plants, Including Single-Domain Protein Disulfide Isomerase-Related Proteins. *Plant Physiol* **137**:762-778.
- Huo X, Liu Y, Wang X, Ouyang P, Niu Z, Shi Y and Qiu B (2007) Co-expression of human protein disulfide isomerase (hPDI) enhances secretion of bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **54**:234-239.
- Jefferis R (2005) Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology Progress* **22**:11-16.
- Jones SD, Castillo FJ and Levine HL (2007) Advances in the development of therapeutics Monoclonal Antibodies. *BioPharm International*.
- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M and Angenon G (1997) An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* **122**:101-108.
- Kathuria S, Sriraman R, Nath R, Sack M, Pal R, Artsaenko O, Talwar GP, Fischer R and Finnern R (2002) Efficacy of plant-produced recombinant antibodies against HCG. *Human Reproduction* **17**:2054-2061.
- Khoudi H, Laberge S, Ferullo J-M, Bazin R, Darveau A, Castonguay Y, Allard G, Lemieux R and Vézina L-P (1999) Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnology and Bioengineering* **64**:135-

- 143.
- Köhler G and Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**:495-497.
- Krishna P and Gloor G (2001) The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell stress & chaperones* **6**:238.
- Kusnadi AR, Nikolov ZL and Howard JA (1997) Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering* **56**:473-484.
- Kwon T-H, Kim Y-S, Lee J-H and Yang M-S (2003) Production and secretion of biologically active human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic tomato suspension cultures. *Biotechnology Letters* **25**:1571-1574.
- Landy A (1989) Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of lambda Site-Specific Recombination. *Annual Review of Biochemistry* **58**:913-941.
- Larrick JW, Yu L, Naftzger C, Jaiswal S and Wycoff K (2001) Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomolecular Engineering* **18**:87-94.
- Le Fourn Vr, Siffroi-Fernandez S, Ferrand M and Franc J-L (2006) Competition between Calnexin and BiP in the Endoplasmic Reticulum Can Lead to the Folding or Degradation of Human Thyroperoxidase. *Biochemistry* **45**:7380-7388.
- Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fischette-Lainé A-C, Gomord V and Faye L (1998) N-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Molecular Biology* **38**:31-48.
- Lerouxel O, Mouille G, Andème-Onzighi C, Bruyant M-P, Séveno M, Loutelier-Bourhis C, Driouich A, Höfte H and Lerouge P (2005) Mutants in DEFECTIVE GLYCOSYLATION, an *Arabidopsis* homolog of an oligosaccharyltransferase complex subunit, show protein underglycosylation and defects in cell differentiation and growth. *The Plant Journal* **42**:455-468.
- Levin JS, Thompson WF, Csinos AS, Stephenson MG and Weissinger AK (2005) Matrix attachment regions increase the efficiency and stability of RNA-mediated resistance to Tomato Spotted Wilt Virus in transgenic tobacco. *Transgenic Research* **14**:193-206.
- Lonberg N (2005) Human antibodies from transgenic animals. *Nature Biotechnology* **23**:1117-1125.

- Ma JKC, Chikwamba R, Sparrow P, Fischer R, Mahoney R and Twyman RM (2005) Plant-derived pharmaceuticals - the road forward. *Trends in Plant Science* **10**:580-585.
- Ma JKC, Drake PMW and Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* **4**:794-805.
- Ma JKC, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, Van Dolleweerd C, Mostov K and Lehner T (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* **268**:716-719.
- Marty F (1999) Plant Vacuoles. *Plant Cell* **11**:587-600.
- Matheson LA, Hanton SL and Brandizzi F (2006) Traffic between the plant endoplasmic reticulum and Golgi apparatus: to the Golgi and beyond. *Current Opinion in Plant Biology* **9**:601-609.
- Matz M, Fradkov A, Labas Y, Savitsky A, Zraisky A, Markelov M and Lukyanov S (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology* **17**:969-973.
- Menkhaus TJ, Bai Y, Zhang C, Nikolov ZL and Glatz CE (2004) Considerations for the Recovery of Recombinant Proteins from Plants. *Biotechnology Progress* **20**:1001-1014.
- Miele L (1997) Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. *Trends in Biotechnology* **15**:45-50.
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA and Oi VT (1984) Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:6851-6855.
- Nebenführ A (2008) Organelle dynamics during cell division. *Cell Division Control in Plants*:195-206.
- Nelson BK, Cai X and Nebenführ A (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal* **51**:1126-1136.
- Newman R, Albert J, Anderson D, Carner K, Heard C, F. N, Raab R, Reff M, Shuey S and Hanna N (1992) "Primatization" of recombinant antibodies for immunotherapy of diseases: A macaque/human chimeric antibody against human CD4. *Nature Biotechnology* **10**:1455-1460.
- Oh SJ, Jeong JS, Kim EH, Yi NR, Yi SI, Jang IC, Kim YS, Suh SC, Nahm BH and Kim

- JK (2005) Matrix attachment region from the chicken lysozyme locus reduces variability in transgene expression and confers copy number-dependence in transgenic rice plants. *Plant Cell Reports* **24**:145-154.
- Paccalet T, Bardor M, Rihouey C, Delmas F, Chevalier C, D'Aoust M-A, Faye L, Vézina L, Gomord V and Lerouge P (2007) Engineering of a sialic acid synthesis pathway in transgenic plants by expression of bacterial Neu5Ac-synthesizing enzymes. *Plant Biotechnology Journal* **5**:16-25.
- Paris N, Stanley CM, Jones RL and Rogers JC (1996) Plant Cells Contain Two Functionally Distinct Vacuolar Compartments. *Cell* **85**:563-572.
- Peterson ML, Gimmi ER and Perry RP (1991 ) The developmentally regulated shift from membrane to secreted mu mRNA production is accompanied by an increase in cleavage-polyadenylation efficiency but no measurable change in splicing efficiency. . *Molecular Cell Biology* **11**:2324-2327.
- Petrucelli S, Otegui MS, Lareu F, Tran Dinh O, Fitchette A, Circosta A, Rumbo M, Bardor M, Carcamo R, Gomord V and N. BR (2006) A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds. *Plant Biotechnology Journal* **4**:511-527.
- Raden D, Hildebrandt S, Xu P, Bell E, III FJD and Robinson AS (2005) Analysis of cellular response to protein overexpression. *IEE Proceedings - Systems Biology* **152**:285-289.
- Rakestraw A and Wittrup KD (2006) Contrasting secretory processing of simultaneously expressed heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* **93**:896-905.
- Reichert JM (2003) Trends in Development And Approval Times For New Therapeutics In The United States. *Nature Reviews Drug Discovery* **2**:695-702.
- Reichert JM (2007) Trends in the development and approval of monoclonal antibodies for viral infections. *BioDrugs* **21**:1-7.
- Reichert JM (2008) Monoclonal Antibodies as Innovative Therapeutics. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **9**:423-130.
- Reymond JL, Jahangiri GK, Stoudt C and Lerner RA (1993) ChemInform Abstract: Antibody-Catalyzed Hydrolysis of Enol Ethers. *ChemInform* **24**:no-no.
- Riechmann L, Clark M, Waldmann H and Winter G (1988) Reshaping human antibodies

- for therapy. *Nature* **332**:323-327.
- Rogers J, Early P, Carter C, Calame K, Bond M, Hood L and Wall R (1980) Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin  $\mu$  chain. *Cell* **20**:303-312.
- Saint-Jore-Dupas C, Faye L and Gomord V (2007) From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends in Biotechnology* **25**:317-323.
- Sarkar G and Sommer SS (1990) The "megaprimer" method of side-directed mutagenesis. *Biotechniques* **8**:404-407.
- Satoh M, Iida S and Shitara K (2006) Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. *Expert Opinion on Biological Therapy* **6**:1161-1173.
- Schillberg S, Emans N and Fischer R (2002) Antibody molecular farming in plants and plant cells. *Phytochemistry Reviews* **1**:45-54.
- Shadwick FS and Doran PM (2005) *Foreign Protein Expression Using Plant Cell Suspension and Hairy Root Cultures*:Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE and Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotech* **22**:1567-1572.
- Shaner NC, Steinbach PA and Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Meth* **2**:905-909.
- Sharp JM and Doran PM (2001) Strategies for Enhancing Monoclonal Antibody Accumulation in Plant Cell and Organ Cultures. *Biotechnology Progress* **17**:979-992.
- Shin Y-J, Hong S-Y, Kwon T-H, Jang Y-S and Yang M-S (2003) High level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering* **82**:778-783.
- Shirai K and Fukuda Y (2006) The tobacco CHN50 matrix attachment region enhances transformation frequency. *PLANT BIOTECHNOLOGY-TOKYO-* **23**:535.
- Siemering KR, Golbik R, Sever R and Haseloff J (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology* **6**:1653-1663.
- Sijmons PC, Dekker BM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJ and Hoekema A (1990) Production of correctly processed human serum albumin in

- transgenic plants. *Biotechnology (NY)* **8**:217-221.
- Smith ML, Mason HS and Shuler ML (2002) Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in plant cell culture: Kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form. *Biotechnology and Bioengineering* **80**:812-822.
- Snapp EL, Sharma A, Lippincott-Schwartz J and Hegde RS (2006) Monitoring chaperone engagement of substrates in the endoplasmic reticulum of live cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:6536-6541.
- Sourrouille C, Marquet-Blouin E, D'Aoust M-A, Kiefer-Meyer M-C, Seveno M, Pagny-Salehabadi S, Bardor M, Durambur G, Lerouge P, Vezina L and Gomord V (2008) Down-regulated expression of plant-specific glycoepitopes in alfalfa. *Plant Biotechnology Journal* **6**:702-721.
- Sriraman R, Bardor M, Sack M, Vaquero C, Faye L, Fischer R, Finnern R and Lerouge P (2004) Recombinant anti-hCG antibodies retained in the endoplasmic reticulum of transformed plants lack core-xylose and core- $\alpha$ (1,3)-fucose residues. *Plant Biotechnology Journal* **2**:279-287.
- Staehelin LA (1997) The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *The Plant Journal* **11**:1151-1165.
- Stein KE and Webber KO (2001) The regulation of biologic products derived from bioengineered plants. *Current Opinion in Biotechnology* **12**:308-311.
- Stoger E, Ma JKC, Fischer R and Christou P (2005) Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Current Opinion in Biotechnology* **16**:167-173.
- Surpin M and Raikhel N (2004) Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:100-109.
- Terashima M, Murai Y, Kawamura M, Nakinishi S, Stoltz T, Chen L, Drohan W, Rodriguez RL and Katoh S (1999) Production of human alpha 1-antitrypsin by plant cell culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**:516-523.
- Tetko IV, Haberer G, Rudd S, Meyers B, Mewes H-W and Mayer KFX (2006) Spatiotemporal Expression Control Correlates with Intragenic Scaffold Matrix Attachment Regions (S/MARs) in <http://www.w3.org/1999/xlink> content-type="genus-species" xlink:type="simple">Arabidopsis thaliana</a>. *PLoS Comput Biol*

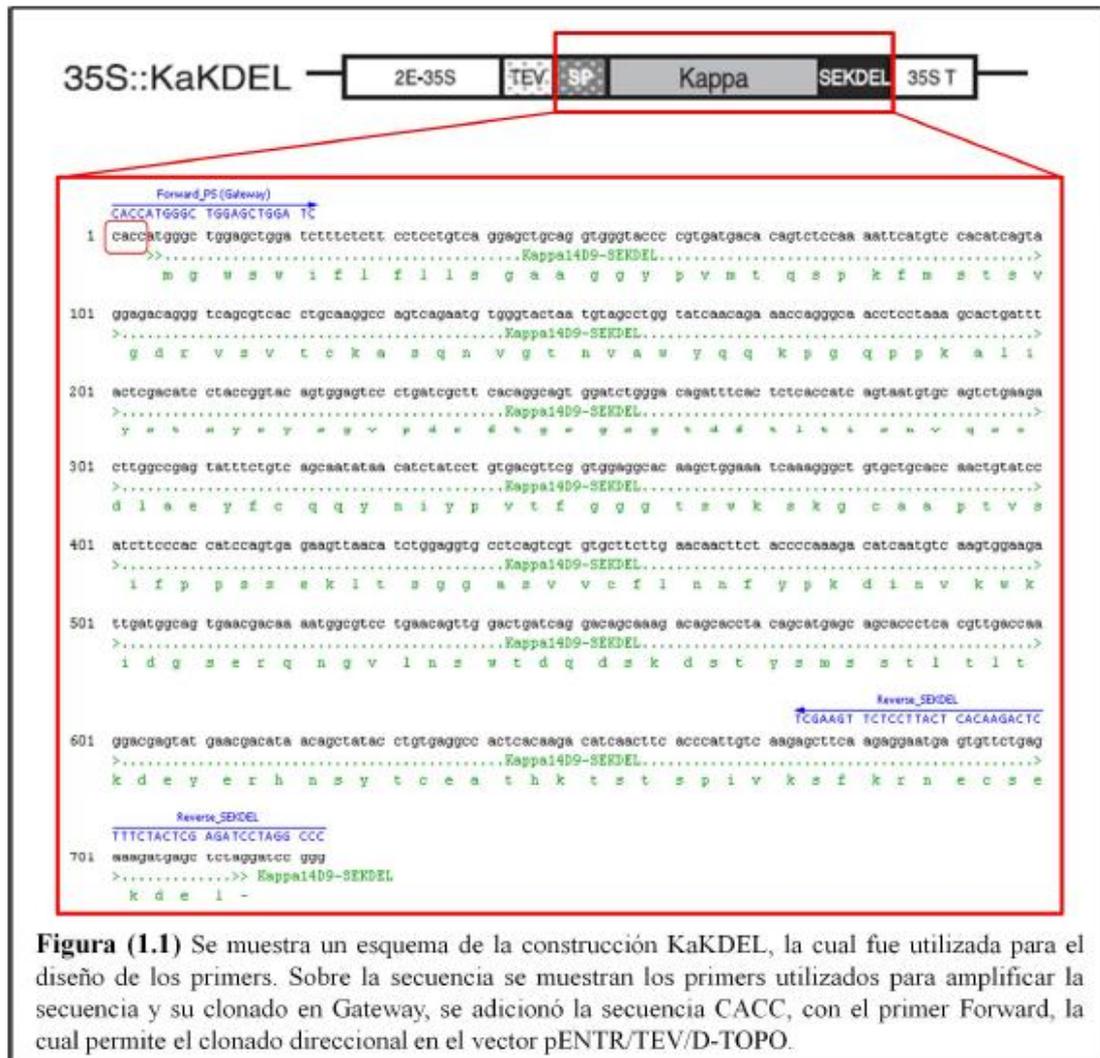
- 2:e21.
- Twyman RM, Schillberg S and Fischer R (2005) Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opin Emerging Drugs* **10**:1.
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* **21**:570-578.
- Ulrich Hartl F and Martin J (1995) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Current Opinion in Structural Biology* **5**:92-102.
- Vain P, Worland B, Kohli A, Snape JW, Christou P, Allen GC and Thompson WF (1999) Matrix attachment regions increase transgene expression levels and stability in transgenic rice plants and their progeny. *The Plant Journal* **18**:233-242.
- Vaquero C, Sack M, Schuster F, Finnern R, Drossard Jr, Schumann D, Reimann A and Fischer R (2002) A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco. *The FASEB Journal*.
- Verma D, Verma M, Dey M, Jain RK and Wu R (2005) Molecular dissection of the tobacco Rb7 matrix attachment region (MAR): Effect of 5' half on gene expression in rice. *Plant Science* **169**:704-711.
- Vitale A and Raikhel NV (1999) What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends in Plant Science* **4**:149-155.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P and Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* **33**:949-956.
- Walsh G and Jefferis R (2006) Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotech* **24**:1241-1252.
- Walter P and Blobel G (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *The Journal of Cell Biology* **91**:551-556.
- Ward TH and Brandizzi F (2004) Dynamics of proteins in Golgi membranes: comparisons between mammalian and plant cells highlighted by photobleaching techniques. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**:172-185.
- Wycoff KL (2005) Secretory IgA Antibodies from Plants. *Current Pharmaceutical Design* **11**:2429-2437.

- Xu P, Raden D, Doyle Iii FJ and Robinson AS (2005) Analysis of unfolded protein response during single-chain antibody expression in *Saccaromyces cerevisiae* reveals different roles for BiP and PDI in folding. *Metabolic Engineering* **7**:269-279.
- Yang D, Wu L, Hwang Y-S, Chen L and Huang N (2001) Expression of the REB transcriptional activator in rice grains improves the yield of recombinant proteins whose genes are controlled by a Reb-responsive promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:11438-11443.
- Zeleny R, Leonard R, Dorfner G, Dalik T, Kolarich D and Altmann F (2006) Molecular cloning and characterization of a plant [alpha]1,3/4-fucosidase based on sequence tags from almond fucosidase I. *Phytochemistry* **67**:641-648.

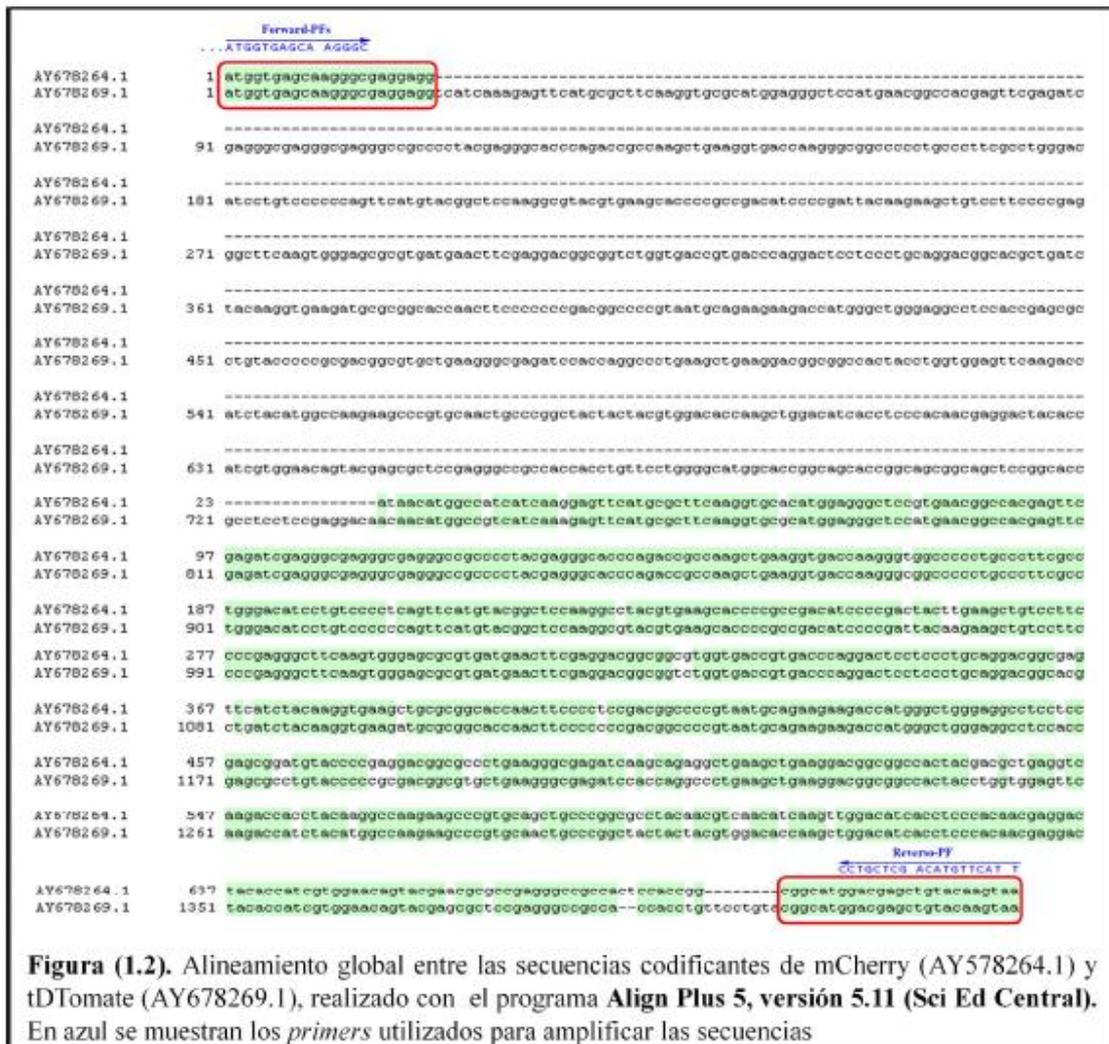
# **ANEXO**

## Anexo

### Anexo 1.1: Secuencia de KaKDEL utilizada para el diseño del primer Reverso-Fusión

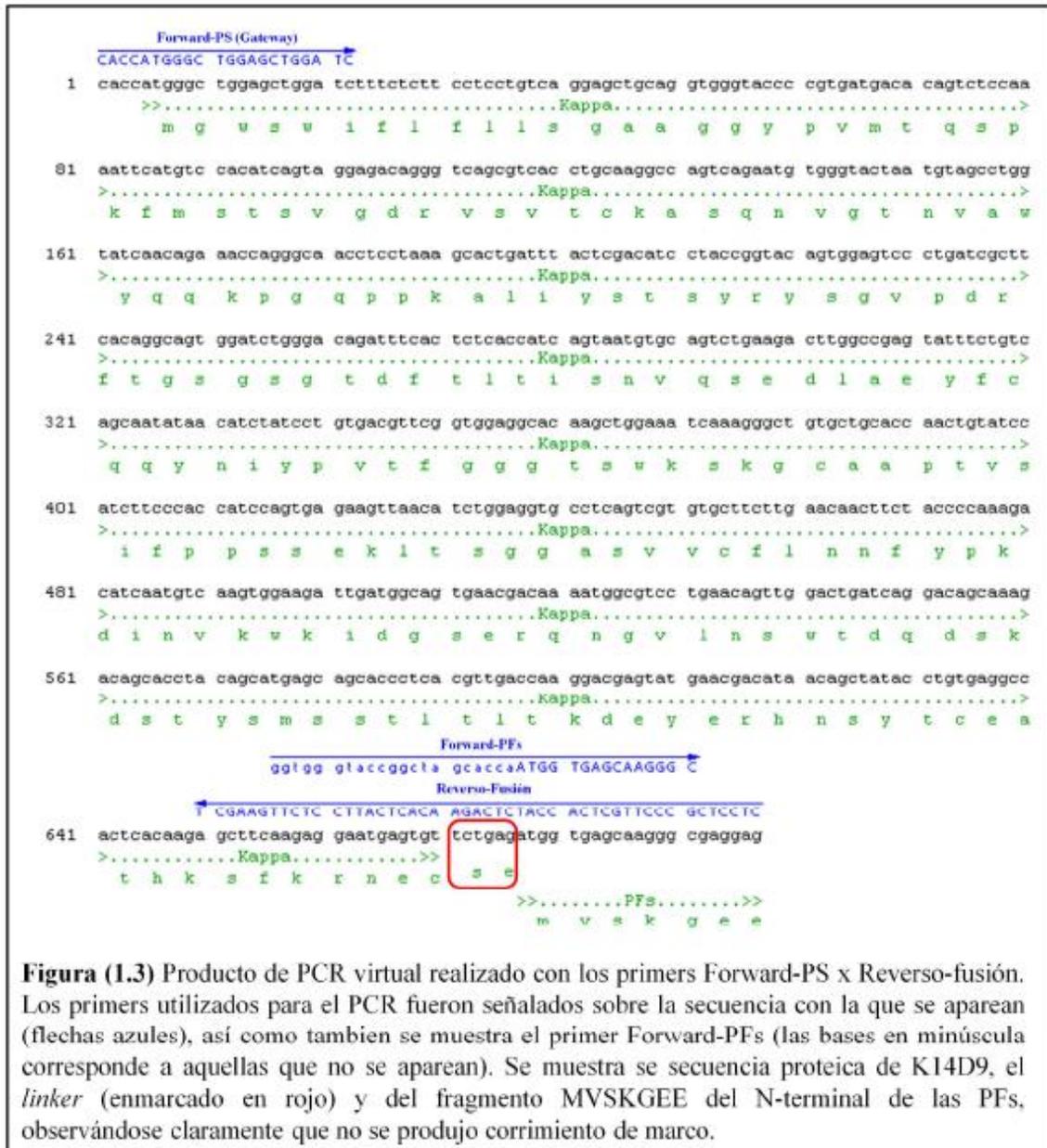


**Anexo 1.2: Alineamiento global de las secuencias codificantes de mCherry y tDTomato**



**Figura (1.2).** Alineamiento global entre las secuencias codificantes de mCherry (AY578264.1) y tDTomate (AY678269.1), realizado con el programa **Align Plus 5, versión 5.11 (Sci Ed Central)**. En azul se muestran los *primers* utilizados para amplificar las secuencias

### Anexo 1.3: PCR virtual para la amplificación de PS-Kappa utilizando los primers: Forward-PS y Reverso-Fusión



### Anexo 1.4: Mapa de los vectores de clonado obtenidos para cada construcción.

