



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Estudio del efecto de genes involucrados en el desarrollo de la vía secretoria y su aplicación a la producción de proteínas recombinantes en células vegetales”

Autora: Lic. Flavia Noelia Mazzini

Directora: Dra. Silvana Petruccelli

Año: 2019

El presente trabajo de Tesis es para optar al título de DOCTORA de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata, Área Ciencias Biológicas, realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA, UNLP, CONICET CCT La Plata, CIC), bajo la dirección de la Dra. Silvana Petruccelli.

La Plata, 2019

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Partes de libros publicados en relación a esta tesis:

Mazzini, F. N., & Petruccelli, S. (2017). Diseño de estrategias para producir proteínas foráneas utilizando las distintas plataformas basadas en plantas. En S. Petruccelli, *Las plataformas de producción de proteínas basadas en plantas. Tecnologías disponibles y estado de desarrollo*. (págs. 49-95). Editorial Académica Española.

PARTICIPACIÓN EN REUNIONES CIENTÍFICAS

Comunicaciones como póster:

1. “Impact of the over expression of plant transmembrane bZIP transcription factors on the synthesis of antibodies in *N. benthamiana* leaves” en Biotecnología Habana 2017: La Biotecnología agropecuaria en el siglo XXI en La Habana, Cuba. Fecha: 3 al 6 de Diciembre 2017.
2. “Increasing foreign protein yields in the plant secretory pathway by overexpression of plant transmembrane bZIP transcription factors” en el 11th International Congress of Plant Molecular Biology en Foz do Iguazu, Brasil. Fecha: 25 al 30 de Octubre 2015.
3. “Efecto de factores bZIP transmembrana en la síntesis de proteínas en la vía secretoria de células vegetales” en la Exposición y Congreso Internacional de Farmacia y Bioquímica Industrial en Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Fecha: 4 al 7 de Agosto de 2015.

Mi reconocimiento,

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado la Beca Doctoral, que me permitió realizar el presente trabajo.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANCyPT), al CONICET, y la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) por los fondos otorgados que permitieron la realización de este trabajo.

A las autoridades actuales del CIDCA, la Dra. Andrea Gomez-Zavaglia y la Dra. Ma. Cecilia Puppo, por permitirme realizar mi trabajo de investigación en el Centro. Y a las autoridades anteriores, la Dra. Noemí Zaritzky y el Dr. Rodolfo Mascheroni, por haberme abierto las puertas del CIDCA.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, que me aceptaron en la Carrera de Doctorado en la misma Facultad que me formó como Licenciada en Biotecnología y Biología Molecular.

Mi agradecimiento,

A la Dra. Silvana Petruccelli por aceptarme como parte de su grupo, por guiarme en el comienzo de mi carrera profesional y por contribuir enormemente en la escritura de este manuscrito.

A toda mi familia: A mi mamá Estela, por estar siempre atenta a lo que necesito, por siempre contenerme y brindarme su calidez y ternura. A mi papá Héctor, por motivarme siempre a seguir, por inculcarme la perseverancia, aconsejarme y ser mi sostén en los días difíciles. A mi hermana Leila por ser mi segunda psicóloga, por bancarme, escucharme y aconsejarme. A Patricia por enseñarme otra manera de ver las cosas y ponerle actitud a todo. A mi abuela Josefina por interesarse siempre por *“lo que hace la nena”* y mimarme cuando voy a Roca. A mi abuelo Ricardo que aunque ya no esté, fue siempre un ejemplo de lucha, que me enseñó que hay que pelearla y rebusárselas como uno pueda. Sé que desde algún lugar viejito seguís alentando a tu Boquita querido, y espero que también al Pincha. Extraño nuestras charlas futboleras, tus chistes tontos y las partidas de truco. A mi nona Flavia, donde quiera que estés, siempre estás en mi corazón! Y a Uvita por llegar a mi vida y acompañarme en el día a día.

A Vanesuli, mi gran amiga Vane... La hermana del alma que me dio el doctorado. Esta experiencia fue sin dudas mucho mejor con vos al lado. Gracias por cada abrazo, cada consejo y cada momento compartido dentro y fuera del laboratorio. Gracias por enseñarme a ver la vida de otra manera, a valorar ciertas cosas y a dejar de darle importancia a tantas otras. Gracias por dejarme ser parte de la vida de Iru.

A Irune, por ganarse mi corazón desde que era tan solo un grupito de células. Por su ternura, su imaginación, por todo el amor que me das, por abstraerme del mundo dejando de lado los problemas y preocupaciones. Ser tía es lo más lindo que hay!

A Soledoro, por compartir la pasión pincharrata y bancarme las crisis de escritura. Por las birras, los mates, las guitarreadas y mucho más.

A mis amigas de la Facultad (y de más allá): Ceci, Pau, Marti, Milin, Meli, Lud, Anello y Marita por seguir acompañándonos y compartiendo la vida. Por los viajes y las anécdotas. Por ser mi sostén y mi cable a tierra.

A mis amigas de Roca, especialmente Ara y Bel, que a pesar de la distancia siempre estuvieron y siguen estando.

A Mati, por compartirme su locura y ser mi pareja de baile.

A Nancy, por guiarme en un camino de muchísimo crecimiento personal, por ayudarme a redescubrirme y por bancarse mis improvisadas clases de biología molecular.

A mis compañeros del labo por hacer que todo sea más ameno, por generar un hermoso ambiente de trabajo, por bancarse Radio Disney y por las bolufrases! Gracias a Caro, Coqui, Flor y Pía, por estar en el día a día, por la tarea grupal, por los mates, el café batido y los abrazos. A Fer especialmente por acompañarme en el momento más difícil de esta etapa, por las birras y las papas. A Coti por confiar en mí para iniciar su paso por un laboratorio de investigación. A Fabri por aconsejarme y guiarme.

A los proteicos por darme siempre la bienvenida en su laboratorio y estar siempre dispuestos a colaborar. Por las consultas respondidas, por los reactivos prestados, pero sobretodo por la buena onda y la comida!!!

Al Dr. Juan José Guiamet del Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE) por prestarme el sensor PAR y estar siempre dispuesto a mis consultas.

A Gabo, Eduardo y Claudio por estar siempre dispuestos a colaborar y por proveerme de *Nicotianas*.

Al personal técnico del CIDCA, especialmente a Matías Contreras, José Luis Alonso, Pablo Mulán y Nicolás Milanese por la instalación de las luces y el acondicionamiento del cuarto de cultivo para las plantas utilizadas en este trabajo.

A los becarios del CIDCA por permitirme representarlos ante el Consejo Directivo del Centro.

MUCHAS GRACIAS!!!

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS _____	II
RESUMEN _____	III
INTRODUCCIÓN _____	- 1 -
1.- Las plantas como sistema de expresión de proteínas heterólogas. _____	- 2 -
1.1.- Antecedentes en la expresión de proteínas recombinantes. _____	- 2 -
1.2.- Diversidad de las plataformas de expresión en plantas. _____	- 2 -
1.3.- Ventajas de las plantas como sistema de expresión. _____	- 4 -
1.4.- Casos de éxito de plataformas basadas en plantas. _____	- 6 -
2.- Diseño de estrategias para la expresión de proteínas heterólogas en plantas. ____	- 8 -
2.1.- Consideraciones generales sobre las estrategias de expresión _____	- 8 -
2.2.- Elección de la planta huésped _____	- 9 -
2.3.- Condiciones ambientales de crecimiento. _____	- 10 -
2.4.- Secuencia del gen de interés _____	- 11 -
2.5.- Vector de expresión _____	- 12 -
2.6.- Señales de direccionamiento. _____	- 15 -
2.7.- Otras secuencias utilizadas en la expresión de proteínas heterólogas. ____	- 17 -
3.- Estrategias para incrementar la acumulación de una proteína de interés. ____	- 17 -
3.1.- Estrategias relacionadas con el plegado de proteínas. _____	- 18 -
3.2.- Estrategias relacionadas con la señal UPR. _____	- 19 -
3.3.- Estrategias vinculadas al desarrollo de la vía secretoria. _____	- 21 -
HIPÓTESIS _____	- 23 -
OBJETIVOS _____	- 25 -
RESULTADOS _____	- 27 -
Efecto de las condiciones de luz sobre el crecimiento y producción de proteínas heterólogas de plantas <i>Nicotiana benthamiana</i> . _____	- 28 -
Efecto de las condiciones de luz sobre el crecimiento de plantas <i>Nicotiana benthamiana</i> . _____	- 32 -
Efecto de la fuente de iluminación sobre la expresión de genes reporteros en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> . _____	- 33 -
Análisis de una estrategia de ingeniería de la vía secretoria para incrementar la síntesis de proteínas heterólogas en plantas. _____	- 38 -
Análisis de los genes candidatos. _____	- 38 -
Diseño experimental. _____	- 40 -
Efecto de la sobre-expresión de los genes candidatos sobre los niveles de acumulación de proteínas sencillas en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> . _____	- 42 -
Efecto de la sobre-expresión de los genes candidatos sobre los niveles de acumulación de anticuerpos en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> . _____	- 48 -
DISCUSIÓN _____	- 51 -
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS _____	59
MATERIALES Y MÉTODOS _____	61

1- Materiales	62
2- Métodos	65
3- Análisis estadístico:	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	78

LISTADO DE ABREVIATURAS

A	Azul (450nm)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BiP1	Proteína de unión 1
bZIP	Dominio básico de cremallera de leucina
bZIP60ΔC	Versión truncada del factor de transcripción bZIP60
bZIP28ΔC	Versión truncada del factor de transcripción bZIP28
CaMV35S	Promotor del ARN 35S del virus mosaico de coliflor
CNX1	Calnexina 1
CPMV	Virus del mosaico de frijol
CRA	Contenido relativo de agua
CRT1B	Calreticulina 1B
DA	Dominio activador
DFFF	Densidad de flujo fotónico fotosintético
dpi	Días post infiltración
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600nm
DTM	Dominio transmembrana
ERAD	Degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico
ERQC	Control de calidad del retículo endoplasmático
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FS	Luces LED <i>Full Spectrum</i>
GDI	Gen de interés
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GUS	Enzima β-glucuronidasa
HIS ₆	Tag de histidinas
HSP	Proteínas de shock térmico
KDEL	Señal de retención en el retículo endoplásmico
LED	Diodos emisores de luz
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MUG	4-metil-umbeliferona glucurónido
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
nos	Gen de la nopalina sintasa
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
PBP	Plataformas de producción basadas en plantas
PDI	Proteín-disulfuro isomerasa
PST	Proteínas solubles totales
R	Rojo (660nm)
RA	Luces LED Rojo-Azul
RBS-SS	Promotor de la subunidad pequeña de la RuBisCo
RE	Retículo endoplásmico
RFP	Proteína Fluorescente Roja
RL	Rojo lejano (730nm)
ScFv	Anticuerpo simple cadena
SMR	Subunidad mayor de la RuBisCo
SP	Péptido señal
sRNA	Ácido ribonucleico pequeño
TF	Tubos fluorescentes
TMV	Virus del mosaico de tabaco
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
UA	Unidades arbitrarias
UFR	Unidades de fluorescencia roja
UFV	Unidades de fluorescencia verde
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
UTR	Regiones no traducidas
UV	Ultravioleta
V	Verde -525nm-
Wt	<i>wild type</i>

RESUMEN

El desarrollo de los sistemas de expresión basados en plantas para la producción de proteínas recombinantes constituye un paradigma tanto en la producción de biológicos como de proteínas con diversas aplicaciones como son la investigación médica, la medicina regenerativa, como también las destinadas a la producción de biocombustibles, entre otros. El uso de esta tecnología se consolidó en distintos mercados gracias a algunas ventajas que permitían lidiar con las fallas de los sistemas tradicionales, como por ejemplo la rápida escalabilidad de la producción, la capacidad de síntesis de moléculas que no se sintetizan eficientemente en otros sistemas y la ausencia de endotoxinas y seguridad intrínseca. Las plantas representan además, un sistema de expresión sustentable y amigable con el medio ambiente.

Este trabajo de tesis pretende contribuir al conocimiento de las plantas como fábricas de proteínas recombinantes y se basó en dos grandes aspectos. Por un lado, las condiciones de crecimiento de las plantas, teniendo en cuenta un factor clave que es el bajo costo tanto en la producción de biomasa, como de infraestructura y del proceso downstream. Y por otro lado, el estudio de estrategias que incrementen el rendimiento de producción, teniendo en cuenta que los mismos se encuentran limitados por procesos como el correcto plegado de proteínas y el transporte de las mismas a través de la vía secretoria hacia su destino final.

En una primera sección, se analizó el efecto de la utilización de iluminación LED *Full Spectrum* o Rojo-Azul sobre el crecimiento de plantas *Nicotiana benthamiana* y sobre la producción de proteínas recombinantes en sistemas de expresión transitoria, con respecto a un sistema de iluminación tradicional como son los tubos fluorescentes blancos fríos. Para ello, en primer lugar se determinó la intensidad de luz emitida por cada una de las fuentes de luz estudiadas. Luego se evaluaron parámetros de crecimiento y fisiológicos de plantas *Nicotiana benthamiana* crecidas durante cuatro semanas bajo las distintas luces, como su altura, color, diámetro de hoja, y contenido relativo de agua (CRA). La mejor condición para el crecimiento de las plantas fue la de tubos fluorescentes o luces LED *Full Spectrum* para las cuales las plantas presentaron una coloración verde oscura, tamaños de planta y hojas adecuados para ensayos de agroinfiltración y valores de CRA superiores a 90%. Por otro lado, para evaluar el efecto de las luces sobre la producción de proteínas recombinantes, se analizaron los niveles de expresión de dos proteínas reporteras retenidas en el retículo endoplásmico: la proteína fluorescente verde (RE-GFP) y la enzima β -glucuronidasa (RE-GUS). La mejor condición de luz para la producción de estas proteínas reporteras fue la de tubos fluorescentes, donde se alcanzaron los mayores niveles de RE-GFP y RE-GUS y en donde se obtuvieron los niveles más bajos de la chaperona BiP, que es indicadora de estrés en el retículo endoplásmico.

En la segunda sección de este trabajo, se exploró una estrategia de ingeniería de la vía secretoria a partir del estudio del efecto de la sobreexpresión de distintos genes candidatos sobre la producción de proteínas recombinantes. Los genes candidatos codifican para factores de transcripción del tipo bZIP, homólogos a aquellos que se expresan durante la diferenciación de células secretorias profesionales en otros organismos, o para chaperonas involucradas en el plegado proteico, que se expresan durante fase de acumulación de proteínas de reserva en semillas y también tienen un rol en los procesos vinculados a estrés, tal como la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR. Los genes estudiados en este trabajo codifican para los factores AtbZIP60 (AT1G42990; NM_103458), AtbZIP28 (AT3G10800; NM_111917) y AtbZIP17 (AT2G40950; NM_129659), en sus formas completa o troncada (sin dominio C-terminal - Δ C) y para la chaperona Calnexina1 (CNX1) (AT5G61790). Se evaluó su efecto sobre la expresión de las proteínas reporteras sencillas RE-GFP y RE-GUS y sobre la expresión de proteínas de interés más demandantes en su plegado como la versión simple cadena del anticuerpo 2G3 fusionado a la proteína fluorescente roja y un tag de histidinas (RFP-ScFv-KDEL) y el anticuerpo monoclonal tetramérico 14D9. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de los genes codificantes para la forma activa del factor AtbZIP28 Δ C o la chaperona Calnexina1, provoca un incremento en los niveles de GUS y GFP, como también de moléculas más demandantes para el plegado como los anticuerpos simple cadena 2G3 (RE-RFP-2G3) y multimérico 14D9. La co-expresión de la forma activa del factor bZIP60 Δ C, también produjo incrementos en los niveles de acumulación de las reporteras GUS y GFP pero fue menos efectiva que la obtenida con los genes del bZIP28 Δ C o Calnexina1.

Este trabajo demuestra que la expresión de los genes codificantes para la forma activa del factor AtbZIP28 Δ C o la chaperona Calnexina1, representa una estrategia válida para incrementar los niveles de proteínas reporteras con distintos requerimientos de plegado en plantas *Nicotiana benthamiana* por ensayos de expresión transitoria.

INTRODUCCIÓN



1.- Las plantas como sistema de expresión de proteínas heterólogas.

El término *Molecular Farming*, hace referencia a la producción de proteínas recombinantes en células u organismos animales o vegetales. La palabra *Farming* deriva del término *farm*, que se traduce del inglés como “granja”, haciendo referencia al uso de cultivos agrícolas o animales domésticos como sistema de expresión [1]. La tecnología del ADN recombinante, utilizada ya hace décadas para producir distintos productos de interés, permitió la expresión de proteínas en diversos sistemas, desde bacterias hasta animales y plantas.

1.1.- Antecedentes en la expresión de proteínas recombinantes.

Por su simplicidad, las bacterias fueron los primeros organismos modificados genéticamente para la producción de una proteína de interés, siendo en 1982, la insulina, la primer proteína recombinante producida en *Escherichia coli* aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) y comercializada por Eli Lilly bajo el nombre comercial de Humulin® [2]. Las levaduras también han sido un sistema de expresión que se ha utilizado ampliamente, siendo también la insulina, el primer producto producido en *Saccharomyces cerevisiae* lanzada al mercado en 1987 por la empresa Novo [3]. Bacterias y levaduras han sido desde un comienzo los organismos de elección para la producción de proteínas sencillas. En *E. coli* por ejemplo, se han producido con altos rendimientos proteínas como la fosfatasa alcalina, el factor estimulante de colonias de granulocitos humano (hGCSF -human granulocyte colony-stimulatory factor-) y algunos factores de crecimiento como el IGF-1 (insulin-like growth factor). Las levaduras, han sido el sistema de elección cuando la proteína de interés no es sintetizada correctamente en organismos bacterianos debido al requerimiento de modificaciones postraduccionales como por ejemplo la existencia de enlaces disulfuro o patrones de glicosilación. Algunos productos del mercado producidos en levaduras son la insulina, un antígeno contra el virus de la hepatitis B, la hirudina y el factor de crecimiento derivado de plaquetas [4].

Sin embargo, los patrones de glicosilación producidos en levaduras son generalmente incompatibles con los patrones requeridos por células de mamíferos, por lo que han surgido sistemas de expresión alternativos y de mayor complejidad como las células de insecto. Los baculovirus son el vector de expresión más utilizado en células de insecto permitiendo la transformación de estas células que son capaces de realizar modificaciones postraduccionales de interés en proteínas recombinantes como son: fosforilación, N- y O-glicosilación, y procesamiento proteolítico entre otros; aunque se han alcanzado bajo niveles de expresión utilizando este tipo de sistema.

En última instancia, han surgido como sistemas de expresión los animales y las plantas. Las células de mamífero y los animales transgénicos, aunque son sistemas de alto costo, han sido de elección cuando la proteína de interés requiere de modificaciones postraduccionales propias de mamíferos y han sido utilizados para producir, por ejemplo, eritropoyetina y el activador de plasminógeno tisular (tPA). Las plantas, tanto transgénicas como sus células en cultivo, representan un sistema de expresión mucho más beneficioso en términos de bioseguridad y de bajo costo en comparación con los sistemas animales. Su utilización como organismos productores de proteínas recombinantes es bastante reciente, siendo en el año 2006, una vacuna contra la enfermedad de Newcastle que afecta a las aves de corral, el primer biológico producido en plantas aprobado [5].

1.2- Diversidad de las plataformas de expresión en plantas.

Una de las grandes ventajas que ofrecen los organismos vegetales para la expresión de una proteína heteróloga es la gran variabilidad de posibilidades de transformación, expresión y producción. Para la expresión de una proteína recombinante, pueden utilizarse plantas acuáticas, tales como algas o musgos; o plantas terrestres, de las cuales las más utilizadas son aquellas especies utilizadas en la industria agrícola dado el amplio conocimiento que existe sobre dichas especies y el perfeccionamiento que han alcanzado a lo largo de la historia las técnicas y herramientas utilizadas para su cultivo. Dentro de las especies agrícolas más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes se encuentran el maíz, el arroz, el trigo y la alfalfa.

A su vez, la utilización de organismos vegetales para la producción de una proteína de interés ofrece una amplia variabilidad de posibilidades que van desde el uso de cultivos celulares en biorreactores donde por ejemplo se secreta la proteína de interés al medio extracelular, o limitar la expresión a determinados órganos o tejidos de la planta como las hojas o la semilla, hasta la utilización de la planta entera, ya sea en condiciones controladas en cámaras de cultivo o invernáculos o en ensayos de liberación a campo. La posibilidad de expresar una proteína de interés en algún órgano o tejido en particular, permite evitar efectos dañinos o tóxicos que pudiera provocar la expresión del transgen en la planta entera, permitiendo también que ésta ahorre recursos y energía, expresando el gen de interés sólo en aquellos tejidos donde su producción es más favorable o donde el producto proteico es más estable [6].

La expresión de proteínas en semillas ha sido una herramienta de elección dada la naturaleza de las mismas como un compartimento de almacenamiento para la planta. En las semillas, el producto proteico de interés no solo se encuentra protegido de posibles eventos de degradación, sino que también se obtienen altos rendimientos de producción. Esto, sumado a que las semillas en sí son productos estables a lo largo del tiempo y de fácil almacenamiento [7]. Además, se ha descrito en algunos tejidos de semilla (generalmente endosperma o embrión, dependiendo de la especie) la existencia de estructuras celulares especializadas en la acumulación de proteínas, conocidas como cuerpos proteicos, los cuales son indicador de la función de almacenamiento que prima en este tipo de tejidos. El desarrollo de promotores específicos que dirijan la expresión del transgen en semillas y dentro de ellas hacia los distintos tejidos, ha facilitado la utilización de las mismas para la producción de proteínas heterólogas. Las semillas más utilizadas hasta el momento han sido las de maíz, arroz, cebada y soja debido a que son especies que generan una gran cantidad de biomasa por unidad de área sembrada y tienen un alto contenido proteico. De las especies mencionadas, el maíz tiene el mayor rendimiento anual, sumado a un alto contenido proteico en sus semillas, por lo que se han desarrollado una amplia variedad de herramientas como promotores específicos y técnicas que permiten una fácil manipulación y transformación de esta especie. La desventaja del maíz comparado con otras especies, es que tiene polinización cruzada. El arroz es también una especie de alto rendimiento de granos, de fácil transformación y manipulación y de rápido escalado, sumado a que es una especie autopolinizante [8]. En la tabla 1 se citan algunos ejemplos de proteínas producidas en semillas, detallándose los rendimientos de producción alcanzados. Otros casos de éxito de plataformas de producción en semillas serán descritos con mayor profundidad más adelante.

La expresión en hojas y raíces se ha utilizado también para la producción de proteínas heterólogas, aprovechando la generación de grandes cantidades de biomasa y la posibilidad de rizo-secreción respectivamente. En contraposición con las semillas, tanto las hojas como las raíces pueden transformarse de manera transitoria, lo cual simplifica las cuestiones regulatorias del producto de interés. El tabaco es la especie vegetal más utilizada para la expresión de proteínas en hojas debido al alto rendimiento de biomasa y a que los procedimientos de transformación y expresión en esta especie han sido ya bien establecidos. Además, el tabaco no es de consumo humano como comestible por lo que no existe riesgo de perturbar la cadena alimentaria. Sin embargo, esta especie tiene un alto contenido de alcaloides que pueden resultar tóxicos y sus células producen estructuras de glicosilación heterogéneas que pueden afectar la funcionalidad y aplicabilidad de la proteína de interés. Otras especies cuyas hojas son de uso popular para la expresión de proteínas heterólogas son la alfalfa, la lechuga y la espinaca [9].

En la tabla 1 se citan ejemplos de las diversas plataformas basadas en organismos vegetales que han resultado ser exitosas a la hora de producir productos de interés, alcanzando la etapa comercial o etapas avanzadas del desarrollo. Se puede observar la variabilidad de dichas plataformas que incluyen desde sistemas de producción basados en células en cultivo, hasta semillas transgénicas, utilizando sistemas de expresión estable o transitoria. En general, la expresión en semilla es la estrategia de elección cuando se desea resguardar la integridad de la proteína de interés por largos períodos de tiempo, dado que la semilla es un compartimento natural de reserva de proteínas donde se encuentran protegidas ante eventuales procesos de degradación [10]. La

expresión en hojas en cambio es elegida cuando se requiere de la rápida obtención y escalado del producto proteico.

1.3.- Ventajas de las plantas como sistema de expresión.

El amplio abanico de posibilidades que ofrecen los organismos vegetales como sistema de expresión desde el punto de vista biológico y las ventajas de las diferentes especies utilizadas, ha permitido el desarrollo de diversas técnicas de transformación de plantas, que incluyen la transformación transitoria y la transformación estable, ya sea nuclear o plastídica.

Los métodos de transformación estable implican la integración del ADN recombinante al genoma de la planta y posterior regeneración de la planta a partir de las células transformadas o bien multiplicación de las mismas por cultivo *in vitro*. Aunque este tipo de transformación deriva en asuntos regulatorios más complejos comparados con la transformación transitoria, existen varios productos producidos en plantas que han salido al mercado utilizando este tipo de transformación.

En la transformación transitoria o temporal, el ADN recombinante no se hereda a generaciones subsiguientes y sólo se expresa durante un período de tiempo acotado hasta que es degradado o hasta que se pierde durante la división celular. Por esta razón, la salida al mercado de productos producidos con este tipo de transformación es más fácil. Para llevar a cabo este tipo de transformación en plantas, se ha recurrido al uso de patógenos naturales modificados como *Agrobacterium tumefaciens* o algunos vectores virales como el virus del mosaico de tabaco (TMV, *Tobacco mosaic virus*) y el CPMV (*Cowpea mosaic virus*). Dentro de los vectores virales, se han desarrollado los llamados “vectores deconstruidos” en los que el inserto es más estable, y los “vectores híbridos” que toman las ventajas del *Agrobacterium* para transferir el ADN a la célula vegetal y de los virus para amplificar la transformación. Utilizando los vectores deconstruidos, la empresa Kentucky BioProcessing desarrolló la estrategia Geneware®, que utiliza el replicón del TMV para la transformación. Utilizando esta tecnología, se produjeron diferentes productos farmacéuticos entre los que se destacan la aprotinina recombinante y una vacuna contra la hepatitis B [11]. Por otro lado, la empresa IconGenetics, desarrolló la tecnología de transformación mediada por *Agrobacterium* utilizando vectores híbridos denominados MagnICON®. Este tipo de vectores se utilizó para desarrollar una vacuna personalizada para el tratamiento del linfoma no-Hodking en plantas de *Nicotiana benthamiana* que se encuentra en fase clínica I [12] y en 2014 se ha utilizado para producir un cóctel de tres anticuerpos monoclonales contra glicoproteínas del virus del ébola, comercializado como Zmapp™ [13].

Tabla 1: Diversidad de las plataformas de producción de proteínas de interés basadas en organismos vegetales que alcanzaron la etapa comercial o etapas avanzadas del desarrollo.

Tipo de plataforma	Especie vegetal	Órgano o tejido	Objetivo de su obtención	Rendimientos/ Etapa de desarrollo	Referencias
Células en cultivo	<i>Daucus carota</i> "Zanahoria"	---	Producción de β -glucocerebrosidasa para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.	No informa niveles/ Etapa comercial	[14] www.protalix.com
Células en cultivo	Células BY2 de <i>Nicotiana tabacum</i> "Tabaco"	---	Producción de DNasal resistente a actina para el tratamiento de la fibrosis quística	No informa niveles/ Fase II de pruebas clínicas	[15] www.protalix.com
Cultivo de musgos	<i>Physcomitrella patens</i>	---	Producción de α -galactosidasa-A para la enfermedad de Fabry	50ng/mgPST Fase I de pruebas clínicas	[16] www.greenovation.com
Cultivo de algas verdes	<i>Acutodesmus dimorphus</i>	---	Producción de ácidos grasos para biocombustibles	No informa niveles/ Pruebas preliminares	www.algae.ucsd.edu
Transformación transitoria	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Hojas	Producción de un anticuerpo contra el virus del ébola	---	[17]
Transformación transitoria	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Hojas	Producción de partículas similares al virus de la gripe H5N1	No informa niveles / Fase II de pruebas clínicas	[18]
Transformación estable	<i>Nicotiana tabacum</i> "Tabaco"	Hojas	Anticuerpo contra el virus del ántrax.	3mg por kilo de peso fresco / Pruebas preliminares	[19]; www.planetbiotechnology.com
Transformación estable	<i>Nicotiana tabacum</i> "Tabaco"	Hojas	Producción del anticuerpo 2G12 contra el HIV	25 μ g/g / Pruebas clínicas	[20]
Transformación estable	<i>Oryza sativa</i> "Arroz"	Semillas	Producción de suplementos para cultivo celular	Variable / Etapa comercial	https://ventria.com/
Transformación estable	<i>Oryza sativa</i> "Arroz"	Semillas (endosperma)	Producción de la subunidad B de la toxina colérica.	2,1% de PST.	[21]
Transformación estable	<i>Fragaria x ananassa</i> "Fruitea"	Fruto	Producción de interferón α para el tratamiento de la enfermedad periodontal canina.	Etapa Comercial	http://www.naist.jp/en/
Transformación estable	<i>Cucumis melo</i> "Melon"	Raíces	Producción del activador de plasminógeno tisular (t-PA) humano.	0,17 μ g/mg	[22]

*. PST=proteína soluble total.

Además de su versatilidad como sistema de expresión, las plantas cuentan con otra gran ventaja que es la facilidad de escalado que implica simplemente el aumento del número de plantas a transformar. Las técnicas descritas anteriormente aplicadas al área de molecular farming permiten un rápido escalado, lo cual representa una ventaja importante frente a la necesidad de desarrollar productos a corto plazo como en el caso de pandemias o productos contra patógenos muy variables genéticamente como el virus de la influenza estacional. Además, por utilizarse especies vegetales de interés agrícola, se encuentran ya establecidas las buenas prácticas de cosecha, transporte y almacenamiento; esto sumado a que no requiere de personal especializado. Estos aspectos posicionan a las plantas como un sistema muy amigable y sencillo de utilizar comparado con sistemas que requieren el uso de biorreactores para la producción de la proteína de interés.

Otra gran ventaja de los sistemas vegetales es su bioseguridad. A diferencia de los sistemas animales, las plantas no son huéspedes naturales de patógenos humanos ni producen endotoxinas que puedan contaminar el producto de interés, lo que las posiciona como buenos candidatos para la producción de proteínas terapéuticas, evitando reacciones indeseadas.

Por último, otra gran ventaja de las plantas como sistema de expresión es que a diferencia de los sistemas procariotas pueden producir moléculas complejas, incluyendo las modificaciones co- y postraduccionales necesarias para su correcta función y plegado. Los organismos vegetales son capaces de producir puentes disulfuro, añadir residuos glicosídicos, hidroxilar residuos de prolina o producir cortes proteolíticos que pueden ser esenciales para la función del producto de interés y su aplicación. Con el objetivo de mejorar los patrones de glicosilación de plantas, asemejándolos a los obtenidos en humanos, se han aplicado diferentes técnicas de glicoingeniería como por ejemplo el silenciamiento de enzimas específicas de plantas como la xilosa β -(1,2) y fucosa α -(1,3) transferasas [23].

En resumen, las plantas se destacan como sistema de expresión por su bajo costo, fácil escalado, bioseguridad y capacidad de realizar modificaciones postraduccionales. Estas ventajas posicionan a las plantas como buenos candidatos como sistemas de expresión para la producción de proteínas de interés. Sin embargo, los rendimientos obtenidos en células vegetales podrían mejorarse aún más para obtener mayor rentabilidad y estabilidad del producto proteico.

1.4.- Casos de éxito de plataformas basadas en plantas.

Dadas las ventajas descritas anteriormente en conjunto con el desarrollo de nuevas técnicas de expresión de proteínas en plantas, han ido surgiendo en los últimos años diversas plataformas de producción basadas en organismos vegetales. En la Tabla 2, se mencionan algunos casos de éxito de plataformas que se encuentran en el mercado o en etapas avanzadas de desarrollo. La mayoría de los ejemplos citados en la tabla consisten en sistemas de expresión basados en técnicas de transformación estable, entre los que se destaca por ejemplo, la empresa CollPlant (Israel, <http://www.collplant.com>) que produce colágeno humano en plantas transgénicas de tabaco. Este colágeno humano recombinante tiene mejores características físicas que el obtenido de cadáveres para la regeneración de la matriz extracelular e ingeniería de tejidos y es mejor en términos de bioseguridad. El colágeno humano, requiere de modificaciones postraduccionales para ensamblarse en fibras, producidas por enzimas humanas como las prolil-4-hidroxilasas α y β y la lisil-hidroxilasa. Los genes que codifican las enzimas necesarias para realizar estas modificaciones, han sido co-expresados en plantas transgénicas de tabaco obteniéndose una molécula capaz de inducir la proliferación de células humanas [24]. Este colágeno humano producido por la empresa CollPlant en plantas de tabaco es comercializado bajo el nombre de Vergenix®FG en Europa [25], [26].

Tabla 2: Casos de éxito de plataformas de producción de proteínas en plantas.

Producto	Marca comercial	Organismo	Empresa	Referencia
Colágeno humano	Vergenix®FG	Tabaco	CollPlant	www.collplant.com
Glucocerebrosidasa	Elelyso®	Células de zanahoria	Protalix Therapeutics	www.protalix.com
Tripsina bovina	TrypZean®	Maíz	Prodigene*	www.sigmaaldrich.com
Avidina	---	Maíz	Prodigene*	Hood y col. (1997)[27]
Lactoferrina humana	VEN100	Semillas de arroz	Ventria Bioscience	www.ventria.com
Lisozima humana	Lysobac	Semillas de arroz	In Vitria	www.invitria.com
Interleukina-2 humana	ISOkine™ (01-A0030)	Semillas de cebada	ORF Genetics**	www.orfgenetics.com
Interferón Gamma	ISOkine™ (01-A0060)	Semillas de cebada	ORF Genetics**	www.orfgenetics.com [28]
Exocelulasa	CBH I	Semillas de maíz	Infinite Enzymes	www.infiniteenzymes.com
α-Amilasa	EnoGen®	Semillas de maíz	Syngenta	www.syngenta-us.com
Quimosina	Cártamo SPC	Cártamo	Bioceres SA y Porta Hnos SA	www.indear.com

*La empresa Prodigene quebró pero su tripsina bovina recombinante es comercializada en la actualidad por Sigma Aldrich.**Solo se mencionan algunos productos de la empresa ORF Genetics, la cual produce una gran variedad de factores de crecimiento libres de endotoxinas en cebada.

Otro ejemplo destacable es la enzima glucocerebrosidasa producida en células de zanahoria en suspensión por la empresa Protalix Therapeutics. Esta enzima se comercializa bajo el nombre de Elelyso®, es utilizada para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher y fue el primer biofarmacéutico producido aprobado por la FDA en el año 2012. Además se encuentran en etapas de desarrollo otros productos como la Pegunigalsidasa-α (PRX-102) para el tratamiento de la enfermedad de Fabry, la Alidornasa-α (PRX-110) para el tratamiento de la Fibrosis Quística y una proteína anti-TNF (factor de necrosis tumoral) (OPRX-106) para el tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunes por secuestro del TNF. La empresa Protalix no sólo se dedica al desarrollo de nuevos productos sino que vende la utilización de su plataforma de producción ProCellEx® en células de zanahoria como servicio para la expresión de otras proteínas recombinantes.

Los sistemas de expresión basados en plantas, también han sido utilizados para la producción de biorreactivos que requieren que la molécula producida mantenga su actividad biológica y especificidad. Muchas de estas proteínas son sintetizadas en la vía secretoria y requieren un tipo de procesamiento que sólo se logra en sistemas eucariotas superiores, sumando a que la producción en plantas resulta ser competitiva en términos de costos. Un ejemplo de esto es la tripsina bovina, producida en semillas de maíz. Este producto desarrollado por la empresa Prodigene® es hoy en día comercializada por Sigma Aldrich.

Otros ejemplos de producción en plantas son aquellos utilizados para medios de cultivo, fundamentalmente de células de mamíferos ya que las plantas no son hospedadoras de patógenos animales, ya sea virus o priones; por lo que el producto es altamente seguro. La empresa InVitria utiliza semillas de arroz para la producción de este tipo de productos como albúmina y lactoferrina recombinante, lisozima y transferrina humana y factores de crecimiento.

Además de las plataformas basadas en plantas que ya han alcanzado un estado avanzado de desarrollo con un biológico en comercialización, existen varias vacunas y anticuerpos en etapas avanzadas de evaluación clínica o etapas preclínicas, lo cual anticipa el futuro arribo al mercado de nuevos biológicos producidos con estas plataformas.

2.- Diseño de estrategias para la expresión de proteínas heterólogas en plantas.

La producción de proteínas recombinantes ha revolucionado a las industrias farmacéuticas y de producción de biorreactivos y enzimas de uso industrial. En la actualidad la mayor parte de estas moléculas son producidas en microbianos o células de mamíferos con la desventaja de su elevado costo, inmunogenicidad y bajos rendimientos. Frente a esta situación y teniendo en cuenta las ventajas antes mencionadas de las plantas como sistema de expresión, han surgido las plataformas de producción basadas en plantas (PBP, plant based platforms).

Un factor clave para que un sistema de expresión sea rentable es alcanzar altos niveles de acumulación de la proteína foránea, ya que cuanto mayor es el rendimiento menor es el costo de producción. Durante mucho tiempo la utilización de las plantas como sistema para la producción de proteínas recombinantes estuvo limitada ya que los rendimientos obtenidos no las hacían económicamente competitivas.

En los últimos años, se han desarrollado diferentes estrategias con el objetivo de incrementar los niveles de acumulación de proteínas recombinantes. Estas estrategias que se resumen en la figura 1 apuntan a mejorar los procesos de transcripción y traducción del transgen y a aumentar la estabilidad del producto proteico.

La eficiencia de la transcripción depende del diseño del cassette de expresión que incluye la elección del promotor, la señal de terminación de la transcripción, las regiones no traducidas (UTR, *untranslated regions*) 5' y 3' y secuencias que codifican para señales de direccionamiento. También pueden incluirse secuencias que incrementen la transcripción como las secuencias enhancer y MARS (*matrix attachment regions*). Una vez transcrito el gen de interés, el procesamiento del pre-mRNA que incluye la adición del CAP en el 5', la cola de poli-(A) en el 3' y la eliminación de intrones (*splicing*) también inciden sobre los niveles resultantes de proteína recombinante. Una vez obtenido el mRNA maduro, la eficiencia de traducción depende de la secuencia de Kozak, del uso de codones y de la estructura secundaria del mRNA. A medida que se produce la síntesis de la proteína de interés, el plegamiento del péptido naciente y su transporte a los diferentes compartimientos celulares también inciden sobre el rendimiento final del producto proteico. Por último, la estabilidad y las modificaciones postraduccionales de la proteína recombinante afectarán sus niveles de acumulación y función respectivamente.

A continuación, se describirán algunos aspectos a tener en cuenta al momento de diseñar una estrategia de expresión en plantas con el objetivo de mejorar los rendimientos de proteínas recombinantes.

2.1.- Consideraciones generales sobre las estrategias de expresión

Para la expresión eficiente de un gen de interés (GDI) es importante el diseño de la secuencia codificante, la elección del vector de expresión y la especie vegetal en la que se producirá la proteína.

La elección de la especie vegetal y el órgano o tejido donde se dirigirá la expresión de la proteína de interés depende de varios factores como por ejemplo la escala de producción, la rapidez con que se desea escalar, si se requiere que la producción se lleve a cabo en un ambiente contenido, si la proteína va a ser utilizada en estado crudo o si se requiere un alto grado de pureza. El direccionamiento de la proteína de interés hacia algunos órganos o tejidos puede resultar favorable, como por ejemplo la expresión en semillas donde el producto proteico puede ser almacenado de forma estable por largos períodos de tiempo. Los niveles de acumulación alcanzados se verán influenciados por las condiciones ambientales tales como calidad e intensidad lumínica, temperatura y humedad que pueden derivar en la exposición a diferentes estreses, por lo que estos parámetros requieren de una optimización que es particular para la especie vegetal de elección.

Velocidad de transcripción:

- Promotor utilizado
- Secuencia de terminación de la transcripción.
- Secuencias enhancers (facilitadoras)
- Secuencias silenciadoras
- Secuencias MARS (matrix attachment regions)
- Presencia de intrones
- Silenciamiento transcripcional

Estabilidad y transporte del mRNA:

- Eliminación de intrones
- Edición
- Adición del CAP
- Adición del poly-A
- Presencia de codones de iniciación y terminación
- Estructura secundaria
- Sitios reconocidos por RNAsas
- Secuencias ricas AU
- Silenciamiento postranscripcional

Velocidad de traducción:

- Secuencias 5'UTR y 3'UTR
- Secuencia de Kozak
- Uso de codones
- Estructura secundaria del mRNA

Estabilidad de la proteína:

- Plegamiento correcto
- Localización celular
- Modificaciones
- Fusión a secuencias estabilizadoras

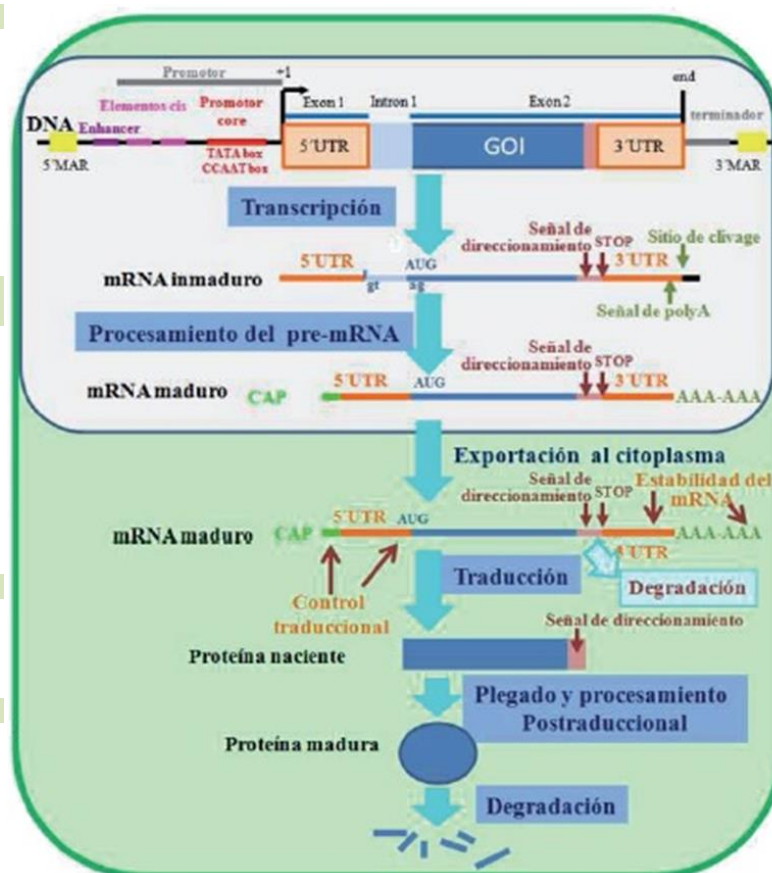


Figura 1: Factores que afectan los niveles de acumulación de una proteína recombinante a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional.

Una vez seleccionada la especie vegetal a utilizar, la secuencia de ADN codificante para el GDI suele modificarse adaptándose al uso de codones de dicha especie; se analiza la estructura del mRNA para eliminar regiones que afecten su estabilidad o interfieran con la traducción.

Otro factor importante en el diseño de la estrategia de expresión es la elección del vector que depende de la especie vegetal a utilizar y del método de transformación, si ésta será estable o transitoria y nuclear o plasmídica. Hoy en día existe una amplia variedad de vectores de expresión disponibles para cada una de las opciones de transformación disponibles. Estos vectores incluyen secuencias que determinan la eficiencia de la transcripción, la estabilidad del mRNA y la eficiencia de traducción, como son las secuencias del promotor, las secuencias 5' y 3' no traducidas (UTR, *untranslated regions*), la secuencia de Kozak y secuencias de finalización de la transcripción.

2.2.- Elección de la planta huésped

El primer paso para diseñar una estrategia de expresión en plantas es la selección de la especie vegetal y el órgano o tejido donde se realizará la expresión. Estos factores son los que determinan los elementos regulatorios que debe tener la construcción del GDI y el vector de expresión adecuado para el método de transformación a utilizar.

La elección de la planta huésped depende de las características de la proteína recombinante, de los rendimientos deseados, de la rapidez con que es necesario aumentar la escala de producción y el uso o aplicación de la proteína recombinante. Las proteínas de aplicación farmacéutica se producen en sistemas contenidos donde es más fácil controlar el proceso, habiéndose utilizado tanto células en suspensión como planta entera, en este último caso por lo general se utilizan métodos de expresión transitoria [7]. En el caso de enzimas y otras proteínas de uso industrial donde se requiere bajo costo y producción a gran escala se utilizan los métodos de expresión estable ya sea en hoja o en semillas [29].

Para la producción de proteínas, pueden utilizarse plantas terrestres, plantas acuáticas, plantas unicelulares o suspensiones de células vegetales. Las plantas terrestres tienen la ventaja de ser fácilmente escalables, mientras que las demás presentan la ventaja de tener condiciones de crecimiento bien estandarizadas, acorde con las buenas prácticas de manufactura.

Dentro de las plantas terrestres, las especies más utilizadas son *N. tabacum* y *N. benthamiana*, algunos cereales como el arroz, el maíz, el trigo y la cebada, las leguminosas como la alfalfa y la soja y los frutos como por ejemplo el tomate y la papa [9].

Tanto en *N. tabacum* y *N. benthamiana* se obtienen grandes cantidades de biomasa y los procedimientos de transformación y expresión génica han sido ampliamente estudiados y estandarizados. Una de las grandes desventajas de estas plantas es la presencia de nicotina y otros alcaloides que deben ser eliminados por su toxicidad. Actualmente la empresa CollPlant (Israel) comercializa colágeno producido en hojas de tabaco empleando expresión estable (<https://www.collplant.com/>). También un anticuerpo para prevención de caries dentales (Planet Biotechnology) y un anticuerpo contra el HIV (Fraunhofer IME), ambos producidos en hojas de tabaco se encuentra en Fase II de evaluación clínica [29]-[31]. Las hojas de alfalfa y soja también han sido utilizadas en molecular farming por su alto rendimiento en biomasa. La alfalfa es de particular interés para la producción de anticuerpos ya que posee un sistema de glicosilación muy homogéneo [32].

La producción en semilla de cereales y leguminosas es ventajosa desde el punto de vista de la bioseguridad y del almacenamiento del producto proteico, ya que es estable por largos períodos de tiempo. Los más utilizados son el maíz y arroz [32].

2.3.- Condiciones ambientales de crecimiento.

Para la producción de proteínas recombinantes en cualquier sistema de expresión, es importante optimizar las condiciones de síntesis de la misma. Esta etapa, recibe el nombre de proceso *upstream*, en la cual pueden modificarse distintos factores con el objetivo de mejorar el rendimiento del proceso productivo.

Para que las plataformas de producción basadas en plantas sean sistemas económicamente viables, es importante que el contenido de proteína recombinante por unidad de biomasa y la productividad de proteína recombinante por unidad de área-tiempo sean altas. En los últimos años se han desarrollado diversas herramientas que permiten mejorar el proceso *upstream* a partir de la optimización de los procesos de transcripción y traducción del gen de interés apuntando a la construcción génica que codifica para la proteína recombinante a producir. Sin embargo, es de particular importancia, como parte de la optimización del proceso *upstream*, controlar los factores ambientales que afectan tanto el crecimiento de la planta como la producción de proteínas recombinantes tales como: densidad de siembra, el suministro de nutrientes, la calidad e intensidad de la luz, la temperatura y la humedad [33]. La optimización y control de estos factores, permitirán mejorar y escalar la producción de proteínas heterólogas.

La luz es uno de los parámetros ambientales más importantes a controlar. Los fotoreceptores de las plantas, responden a la cantidad, calidad y duración (fotoperíodo) de la luz regulando su desarrollo e interviniendo en procesos fisiológicos como la germinación, la elongación y la floración. La densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF o PPF del inglés photosynthetic photon flux density), representa la cantidad de fotones que son utilizados para la fotosíntesis en un rango de longitudes de onda comprendido entre 400nm y 700nm, que representa la radiación fotosintéticamente activa (PAR, del inglés photosynthetic active radiation). Aunque las condiciones pueden ser variadas dependiendo del diseño de la estrategia de producción, en general la DFFF no supera los 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, valor para el cual se alcanza la tasa fotosintética máxima [34], y el fotoperíodo varía entre 16-20 horas de luz, aunque pueden extenderse hasta 24hrs. En cuanto a la calidad de luz, cuando se utilizan sistemas de expresión transitoria, se busca generalmente optimizar las condiciones de crecimiento de manera de maximizar la relación hoja/tallo, y obtener mayor área foliar y en consecuencia, mayor biomasa. Por esta razón, para este tipo de estrategia, se buscan sistemas lumínicos que abarquen al menos cuatro componentes: azul -450nm- (A), verde -525nm- (V), rojo -660nm- (R) y rojo lejano -730nm- (RL), [35]. El azul y el rojo corresponden

a los mayores picos de absorción de la clorofila, por lo que estos componentes de luz son los de mayor eficiencia fotosintética, sin embargo se absorben mayormente en la superficie de las hojas, siendo el componente verde el de mayor contribución fotosintética en las capas de tejido subyacentes [36], [37].

El avance de la tecnología optoelectrónica, permitió desarrollar nuevas fuentes de luz como los diodos emisores de luz, más conocidas por sus siglas en inglés: LED (light-emitting diodes). Este tipo iluminación resulta muy ventajoso para suplementar la luz solar o para el crecimiento de plantas en sistemas cerrados ya que emiten en rangos estrechos por lo que permiten gran flexibilidad en el diseño del sistema lumínico, pudiendo ajustar el espectro de emisión de acuerdo a los requerimientos de la especie vegetal en cuestión. Además, las luces LED son de bajo consumo eléctrico y emiten menos calor que los sistemas de iluminación tradicionales por lo que resultan eco-amigables, reducen los costos de producción y permiten un mejor control de la temperatura y humedad, otros dos parámetros de alto impacto sobre la producción de proteínas recombinantes [38].

En el presente trabajo, se analiza el efecto de dos sistemas de iluminación LED, alternativos al sistema tradicional compuesto por tubos fluorescentes, sobre el crecimiento y producción de proteínas heterólogas en plantas *Nicotiana benthamiana*.

2.4.- Secuencia del gen de interés

Una vez seleccionada la especie vegetal que se utilizará en la producción de la proteína de interés, la secuencia nucleotídica del GDI debe adecuarse a dicha especie. La optimización de codones es una herramienta que tiene impacto directo en el proceso de traducción de un gen y la síntesis de la proteína correspondiente. Durante este proceso, la interacción de cada codón del mRNA con su anti-codon en el tRNA es uno de los factores limitantes. Los tRNAs existentes en una célula se encuentran en distintas cantidades e incluso son variables de una especie a otra, es por eso que la expresión un gen heterólogo puede verse afectada cuando se encuentra en un entorno celular distinto al de origen.

El objetivo de la optimización de codones es modificar la secuencia de ácidos nucleicos, sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína a sintetizar favoreciendo el proceso de traducción. A lo largo de la evolución, se han seleccionado aquellos “codones óptimos”, que son aquellos que se encuentran con mayor frecuencia en los genes que se expresan en altos niveles. Los codones utilizados por los genes altamente expresados generalmente estos corresponden a los tRNAs más abundantes, de manera que ni la cantidad de tRNAs ni el reconocimiento codón-anticodón sean limitantes para el proceso de traducción.

La optimización de codones debe tenerse en cuenta no sólo en la expresión de un gen en otro organismo sino también cuando la proteína resultante es direccionada hacia algún compartimento subcelular o en caso de expresión plasmídica. En cloroplastos por ejemplo hay muchos menos tRNAs comparado con el núcleo de la célula vegetal, por lo que el uso de codones es más crítico. Análisis de secuencias, permitieron ver que los codones óptimos para los cloroplastos se asemejan más a los organismos unicelulares [39].

Actualmente, gracias a la gran cantidad de secuencias disponibles es posible diseñar el transgen de manera de elegir los mejores codones que favorezcan la traducción de proteínas en el organismo huésped. Existen varios ejemplos en los que la optimización de codones ha permitido aumentar los niveles de proteína heteróloga, no solo en plantas (Hiwasa-Tanase et al., 2011; Rouwendal, Mendes, Wolbert, & de Boer, 1997; Perlak, Fuchs, Dean, McPherson, & Fischhoff, 1991) sino también en levaduras [44] y bacterias [45].

En plantas, la subunidad B de la toxina colérica (CTB) por ejemplo ha sido optimizada logrando niveles de expresión hasta 15 veces más altos en comparación con la secuencia de esta toxina proveniente de bacterias [46]. Hoy en día, una vacuna contra el cólera producida en arroz, desarrollada por el Instituto de Ciencias Médicas (Institute of Medical Science) de la Universidad de Tokyo, junto con la empresa Astellas Pharma, se encuentra en etapa I de ensayos clínicos [13]. El rendimiento obtenido fue de 30µg de CTB por semilla [47]. Otro producto producido en plantas que se encuentra en etapa de ensayos clínicos es la hemaglutinina como vacuna para el virus de la

influenza (H1N1) [48]. La secuencia de esta proteína fue optimizada para plantas y se expresó en forma transitoria en partes aéreas de *Nicotiana benthamiana* obteniéndose 60mg de proteína por kilo de biomasa [49], [50].

El avance de la bioinformática y la disponibilidad de secuencias ha permitido generar bases de datos de uso de codones para cada especie (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) y desarrollar herramientas para optimizar la secuencia nucleotídica para el GDI [51]-[53]. Muchos algoritmos maximizan la frecuencia de codones utilizados por genes que se expresan en altos niveles en la especie huésped parámetro denominado CAI (*codon adaptation index*), pero hay otras alternativas como maximizar el contexto del codón (CC, *codon context*) que en vez de tener en cuenta cada codón individual, maximiza el patrón de uso del par de codones del huésped [54]. Independientemente del tipo de algoritmo utilizado, los resultados obtenidos no son siempre positivos. Por ejemplo algunos trabajos informan hasta un incremento de 1000 veces en la síntesis de una proteína empleando un determinado algoritmo mientras que con otros genes y el mismo algoritmo no se observan cambios significativos en los rendimientos [55].

Recientemente se han generado algunas reglas para el diseño de genes que surgen de los estudios realizados con los genes de la luciferasa de luciérnaga (*luc*) y isomaltulosa sintasa de bacterias (*ims*) que son genes susceptibles al silenciamiento y que fueron expresados en caña de azúcar. Los diseños evaluados fueron eliminación de codones raros, remoción de secuencias que generan inestabilidad en el RNA, bloqueo de sitios internos reconocidos por sRNA y randomización de codones no raros. Se analizaron los niveles de mRNA. Se observó un incremento importante en aquellos casos que se removieron secuencias que generan inestabilidad y se hizo un listado de estas secuencias que fueron incorporadas al software Gene Designer 2.0. [56]. Se observaron incrementos 935 y 5 veces en la expresión en callos transgénicos con relación a las secuencias silvestres de *luc* y *ims* cuando se emplearon distintos promotores y estos niveles se mantuvieron por varios años. Estas reglas se pueden aplicar a otros genes susceptibles a silenciamiento [56].

Como no siempre los algoritmos utilizados para optimizar el gen sintético producen mejoras en los rendimientos, se han desarrollado también alternativas experimentales. Un ejemplo es el uso de la técnica conocida como DNA *shuffling* que permite combinar genes relacionados a través de un PCR llamado sexual. Se generan bibliotecas que contienen combinaciones de estos genes relacionados y se realiza un *screening* para identificar aquellos que se expresan mejor. Utilizando esta técnica se obtuvo una variante de GFP que se produce en bacterias con rendimientos 42 veces superiores a la de la variante silvestre [57]. Una variante de esta técnica denominada GRAMMR® fue desarrollada por la empresa Novici Biotech (<http://www.novicibiotech.com/>), y para la optimización de la expresión tabaco introduce las bibliotecas entremezcladas ("*shuffled*") en un vector basado en TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) e identifican aquellos que se producen con mayores rendimientos [58]. iBio Inc. (USA), empresa líder en métodos de expresión temporal firmó un acuerdo con Novici Biotech para utilizar esta tecnología (<https://www.ibioinc.com/>).

2.5.- Vector de expresión

El plásmido donde se inserta el GDI, denominado vector de expresión, posee las secuencias necesarias para que ocurra la expresión génica en el huésped elegido junto con las requeridas para la transformación como ocurre con los vectores binarios utilizados en transformación nuclear empleando agrobacterias.

Estos vectores contienen todos los elementos del llamado *cassette* de expresión necesarios para la correcta transcripción y traducción del gen de interés. Estos elementos son: las secuencias nucleotídicas del promotor de la transcripción, la 5' UTR (*untranslated region*), la de inicio de la traducción, el sitio de inserción del GDI, las secuencias de direccionamiento (variables según el lugar donde se dirija la proteína resultante), la secuencia 3' UTR y la señal de terminación de la transcripción. Estos elementos determinan la eficiencia de los procesos de transcripción y de traducción junto con la estabilidad del mRNA y de la proteína producida. También pueden incluirse secuencias opcionales como las secuencias MARs (*matrix attachment region*) que en caso de transformación estable evitan la formación de heterocromatina o secuencias que incrementen la estabilidad de la proteína o faciliten luego su purificación (Figura 1).

2.5.1.-Promotores

Un factor clave para alcanzar altos niveles de expresión es la elección del promotor. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles.

Los promotores constitutivos tienen los elementos necesarios para ser reconocidos por varios factores de transcripción y activadores que permiten la expresión del gen en la mayor parte de la planta y en diversas condiciones [59]. Los promotores constitutivos más utilizados son el promotor del ARN 35S del virus mosaico de coliflor (CaMV35S) [60], [61], el promotor de actina de arroz (Act1) [62] y el promotor de la ubiquitina de maíz (Ubi1) [63], [64].

En dicotiledóneas, el promotor constitutivo más utilizado es el CaMV35S que se expresa en hojas, raíces, semillas, etc; aunque su actividad es mayor en tejidos jóvenes, células epidérmicas, pelos y haces vasculares. Este promotor, se encuentra disponible en una gran variedad de vectores para su uso en ensayos de expresión ya sea estable o transitoria. Se han descrito también diferentes variantes de este promotor con el fin de aumentar aún más los niveles de expresión [65], como por ejemplo, el desarrollo de promotores sintéticos utilizando regiones de este promotor, o la inclusión de una secuencia “*enhancer*” que puede actuar en dos direcciones y puede aumentar los niveles de expresión hasta 20 veces [59].

El promotor CaMV35S se ha utilizado con diversas aplicaciones, por ejemplo, para la producción de una endoglucanasa que permita la hidrólisis de celulosa para la obtención de azúcares que sirvan de sustrato para la producción de biocombustibles. El gen de la 1,4-β-endoglucanasa E1 bajo la regulación de este promotor se expresó exitosamente en maíz, obteniéndose niveles de hasta 1,13% de proteínas solubles totales [66]. También se produjo la proteína L1 del virus de papiloma humano 8 en *Nicotiana benthamiana*, con el fin de producir una vacuna, alcanzando niveles de hasta 240mg de proteína por kilo de tejido [67].

En el caso de monocotiledóneas el promotor constitutivo más utilizado es Ubi1. Este promotor se ha utilizado por ejemplo para la producción de la subunidad B de la toxina colérica, obteniéndose un rendimiento de 1,8% de las proteínas solubles totales, lo cual es hasta 18 veces mayor cantidad de proteína heteróloga que la obtenida con el promotor 35S [68]. La proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle ha sido producida en maíz, también bajo la regulación de este promotor de plantas, alcanzando rendimientos hasta un 3% de proteína soluble total [69].

Cuando se desea limitar la expresión del GDI a algún órgano o tejido o algún estadio del desarrollo en particular, se utilizan promotores específicos que resultan ventajosos cuando no es necesario que el gen a expresar esté presente en todo el organismo [6]. Para expresión alta en tejidos verdes se recurre frecuentemente al promotor de la subunidad pequeña de la RuBisCo (RBS-SS) y al de plastocianina. En semillas se suelen utilizar promotores de proteínas de reserva como por ejemplo glutelina, faseolina, o globulinas que son muy fuertes en este tejido.

Otra alternativa, es el uso de promotores inducibles que en general contienen secuencias en cis, que son elementos de respuesta a algún estímulo. Estos promotores brindan la posibilidad de limitar la expresión del gen a determinadas situaciones, en respuesta a las condiciones externas y/o internas del organismo. El uso de promotores inducibles resulta ventajoso cuando el GDI puede resultar tóxico o letal para la planta, permitiendo una respuesta específica. Este tipo de promotores, en general contienen secuencias en cis, que son elementos de respuesta a algún estímulo [70]. El promotor RAmy3D es un ejemplo de promotor inducibles que se activa por inanición de sacarosa [71].

En los últimos años con el avance de las técnicas de clonado y la información de las secuencias disponibles han surgido también los promotores sintéticos que están formados por elementos regulatorios de distintos orígenes y el objetivo de su diseño es regular los niveles de expresión según las necesidades. De esta manera han surgido nuevos promotores como el que surge de adicionar al promotor de la manopina sintasa tres secuencias activadoras (*enhancers*) del promotor de la octopina sintasa. Este promotor presenta una actividad más alta que el P-CaMV-35S en hojas, tallos y raíces [72].

2.5.2.- Secuencias 5' y 3' UTR (untranslated regions)

Las secuencias 5' y 3' UTR tienen una función muy importante en la estabilidad del mRNA y en la traducción ya que son el sitio de unión de los factores de inicio de la traducción. Para la sobreexpresión de un GDI, generalmente se utilizan UTRs de origen viral como TMV, TEV o PVX. Los UTR de genes abundantes también funcionan bien como por ejemplo los de la RuBisCo y plastocianina.

Una estrategia para mejorar la transcripción, es la incorporación de un intrón entre la 5'UTR y la secuencia de inicio de la traducción. Esta estrategia ha dado buenos resultados por ejemplo en la expresión de diferentes genes en *Physcomitrella paten* empleando las UTR de los genes de actina y tubulina [16], [73], [74] y en maíz empleando el promotor de la ubiquitina [27], [75]. Por otro lado, La presencia de UTR virales puede hacer al transcripto más susceptible a la degradación, ya que activan mecanismos de silenciamiento génico.

2.5.3.- Secuencia de Kozak

Para una eficiente traducción en células eucariotas es importante que el GDI posea la secuencia de Kozak: (5')A/GCCAUGG(3'), si asignamos el número 1 a la A del AUG, la posición -3 debe tener una A o G y la posición +4 una G [76]. La presencia de estas bases en el entorno de AUG determina que el inicio de la traducción sea más eficiente. Este requerimiento ocurre en todas las células eucariotas incluyendo las vegetales [77]. Otro factor importante es que la secuencia 5'UTR no contenga otros AUG, *upstream* del AUG del GDI ya que esto reduce notoriamente la traducción [78].

2.5.4.- Terminadores de la transcripción.

Los terminadores son secuencias de ADN que permiten la finalización del proceso de transcripción y liberación del transcripto primario. En células eucariotas, estas secuencias incluyen una señal de poliadenilación que promueve un corte en el ARN para la posterior adición de varios nucleótidos de adenina, que forman la llamada cola de poli-(A) (Figura 1). La adición de esta cola de poli-(A), aumenta la estabilidad del mRNA y promueve su exportación desde el núcleo, influyendo directamente en la expresión de un gen.

En mamíferos se ha identificado la señal 5'-AAUAAA-3' como la secuencia consenso para la poliadenilación. Para plantas, se han identificado tres elementos en cis- que están involucrados en la terminación de la transcripción: los NUEs (elemento *upstream* cercano), los FUEs (elemento *upstream* lejano) y el sitio de poliadenilación o clivaje en sí mismo. Los NUE son secuencias ricas en adenina y son análogos a la secuencia señal consenso identificada para mamíferos. Los FUE se ubican *upstream* de los NUE y son necesarios para el correcto reconocimiento del sitio de poliadenilación, de manera que su delección afecta directamente la eficiencia del proceso [79].

El sitio de clivaje para la posterior poliadenilación se encuentra generalmente en zonas ricas en uracilo y en plantas se ha descrito que puede haber más de un sitio de poliadenilación, llamados sitios alternativos (APA, por alternative polyadenylation site). La existencia de estos sitios evidencia la relación directa entre el procesamiento del RNA y la regulación de la función del mRNA resultante, pudiendo generarse mensajeros de distinta longitud, según qué tan alejado esté el sitio alternativo del sitio de poliadenilación original [80].

Entre los terminadores más utilizados en plantas se encuentra el del gen de la nopalina sintasa (Nos), aislado de *Agrobacterium tumefaciens* y del RNA 35S del CaMV.

2.5.5.- Secuencias MARs (matrix attachment regions)

Las secuencias MARs también conocidas como SARs (*scaffold attachment region*) evitan la formación de heterocromatina y se emplean cuando se realiza expresión estable. La utilización de estas secuencias ha logrado por ejemplo un incremento de 140 veces en la actividad β -glucuronidasa en tabaco [81].

2.6.- Señales de direccionamiento.

A la hora de sobre-expresar una proteína de interés, su direccionamiento hacia los distintos compartimentos celulares es de gran importancia por tres razones: en primer lugar, el destino de la proteína afecta su estabilidad y en consecuencia los rendimientos totales obtenidos ya que dependen de la tasa de producción y degradación. Segundo, porque el destino de la proteína es importante para que esta adquiera las modificaciones postraduccionales necesarias para su función. Tercero, porque el lugar donde se acumula la proteína foránea puede afectar la viabilidad celular, teniendo efectos tóxicos o interfiriendo con el metabolismo celular.

La mayor parte de las proteínas recombinantes de interés en biotecnología se sintetizan en vía secretoria. La introducción de las proteínas en esta vía, depende de la presencia de la secuencia codificante para un péptido señal (SP) secretorio, por lo que esta secuencia debe estar presente en la construcción génica a utilizar para la transformación. Dado que estas secuencias están conservadas en eucariotas, puede utilizarse la secuencia de la proteína de interés.

La retención en el retículo endoplásmico por acción de la secuencia carboxilo terminal H/KDEL puede incrementar los rendimientos 2-10 veces [82], [83]. Algunas proteínas foráneas se obtienen con mayores rendimientos en el apoplasto [84] aunque también hay muchas proteínas que se acumulan de manera estable en la vacuola central de tejidos vegetativos [85] o en órganos de reserva en semillas [86]. Si la proteína de interés no requiere de las modificaciones típicas de células eucariotas, la expresión en cloroplastos puede ser una opción para incrementar los rendimientos [87].

Alternativamente si el compartimiento subcelular al que se dirige la proteína tiene mucha actividad proteolítica pueden coexpresarse inhibidores de proteasas para reducir la degradación. Este fenómeno ha sido observado tanto cuando se expresa la proteína de interés en hoja entera dirigiéndola hacia el apoplasto [47], como en suspensiones celulares de arroz en las que se han expresado un inhibidor de proteasas serínicas sintético [88], [89] y también se han silenciado proteasas cisteínicas [90], [91].

En la tabla 3 se presentan ejemplos de los cassettes de expresión empleados en aquellas plataformas de producción de proteínas basadas en plantas que han alcanzado la etapa de comercialización o avanzadas de desarrollo. Se detalla para cada producto, la empresa que lo produjo, la especie vegetal, el método de transformación, el vector, y los elementos del cassette de expresión junto con los rendimientos obtenidos.

Tabla 3: Cassettes de expresión empleados en aquellas PBP que han alcanzado la etapa de comercialización o avanzadas de desarrollo.

Empresa	Proteínas	Especie vegetal y órgano	Método Transformación	Vector	Promotor	5' y 3' UTR	Señal de direccionamiento	Terminación transcripción	Rendimientos/ Comentarios	Ref.
Protalix Biotherapeutics (Israel)	β -glucocerosidasa	Cél de zanahoria en suspensión.	Estable, nuclear	pGREENII	CaMV35S (constitutivo)	5' UTR omega de TMV	SP endoquitin Arabidopsis VSS quitinasa tabaco	Octopina sintasa de <i>A. tumefaciens</i>	No informa niveles.	[92]
Natural Bio Materials (Corea)	Tripsina, enteroquinasa, factores de crecimiento, citoquinas.	Cél de arroz en suspensión	Estable, nuclear	pMYN44 (binario)	RAmy3D (inducible)	5' y 3' UTR alfaamilasa de arroz	SP amilasa 1A arroz	RAmy3D	250mg/L PI se secreta bien.	* [71]
Greenovation Biotech (Alemania)	VEGF, FH, FGF7/KGF, EGF, HGF, asialo-EPO, aGal, GBA	Musgo (<i>Physcomitrella patens</i>)	Estable, nuclear	pRTIOnew	Tubulina β Actina	5' UTR Tub+ intron 5' UTR Act+ intrón	SP de las proteínas humanas	5' pTub UTR	50ng /mg PS Posee un intrón entre el 5' UTR y ATG	[16], [73], [74]
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Cuba)	Inmunoglobulina anti virus de la hepatitis B	Hojas de <i>N. tabacum</i>	Estable, nuclear	pDE1001	CaMV- 35S	omega de 5' UTR TMV	SP de la esporamina + KDEL	Nopalina sintasa	60 mg/Kg	[93], [94]
Consortio Europeo Plant Pharma y Fraunhofer -IME (Alemania)	Anti-HIV, inmunoglobulina G humana. Anti- Plasmodium falciparum IgG humana	Hojas de <i>N. tabacum</i>	Estable, nuclear	pTRAP	2E-CaMV35S	5' UTR y 3' UTR de Chrysanthemum RBC-SS1	SP de la cadena pesada de IgG murina	Chrysanthemum RBC SS1 ter	120 mg /Kg 5' y 3' SAR	[20], [95], [96]
Medicago (Canadá)	Vacuna contra la gripe H1N5, H1N1, H3N2, B	Hojas de <i>N. benthami ana</i>	Transitoria VLP	pCAMBI A2300	Plastocianina	5' y 3' UTR de la plastocianina	SP de la HA del virus de la influenza	Plastocianina	50 mg/Kg	**
Mapp Biopharmaceutical /LeafBio (USA)	ZMapp (Ebola) Palivizumab (RSV)	Hojas de <i>N. benthami ana</i>	Transitoria	MagnICON	Ubiquitina de maíz	5' UTR ubi maíz (con intrón)	SP amilasa cebada	Inhibidor proteína papa II (PinII)	180 mg/Kg	[97]
Sigma Aldrich (Prodigene)	Tripsina Bovina (TrypZean®), Avidina	Maíz /semilla	Estable, nuclear	PHP5168	Glutelina 1	5' UTR Gt1	SP Gt1	T-Nos	230 mg/Kg (avidina) 58mg/Kg Tripsina	[27], [75]

* <http://www.nbms.co.kr>; ** <http://medicago.com>

2.7- Otras secuencias utilizadas en la expresión de proteínas heterólogas.

Otra estrategia que se ha utilizado con el fin de alcanzar mayores rendimientos de la proteína de interés, es la co-expresión con genes que codifican para moléculas supresoras del silenciamiento como por ejemplo la proteína p19 [98]

Más allá de la optimización de las secuencias que regulan la transcripción y traducción del GDI y del diseño de la construcción génica, pueden utilizarse también algunas secuencias que tienen un efecto estabilizador sobre la proteína recombinante. Estas secuencias como las hidrofobinas o los polímeros similares a elastina se fusionan a las secuencia de la proteína de interés y no solo hacen que el péptido sea más estable sino que también facilitan su recuperación abaratando los costos del *downstream* [99]-[101].

3.- Estrategias para incrementar la acumulación de una proteína de interés.

Tal como ya se mencionó anteriormente, la mayoría de las proteínas de interés biotecnológico, se sintetizan en la vía secretoria. A lo largo de esta vía, las proteínas recombinantes pueden encontrar varios cuellos de botella que pueden derivar en una disminución del rendimiento de la proteína de interés.

En eucariotas, la secreción de proteínas comienza con el reconocimiento del péptido señal y la translocación del péptido nascente en el retículo endoplásmico, ingresando así al sistema de endomembranas. Este es el primer cuello de botella que encuentra la proteína de interés y depende de la naturaleza del péptido señal y del mecanismo de translocación, sea co- o postraduccional. Una vez en el RE, es importante para lograr buenos rendimientos, que la proteína de interés se pliegue y procese de manera correcta y eficiente, para lo cual muchas proteínas locales, incluyendo chaperonas y proteínas disulfuro isomerasas son reclutadas. Aquellas proteínas no plegadas o plegadas de manera incorrecta no pasan el control de calidad del retículo y desencadenan diferentes señales celulares. La mayoría de las proteínas mal plegadas, son degradadas en el retículo por un proceso denominado ERAD, del inglés “*ER-associated protein degradation*”. Este mecanismo representa otro cuello de botella e implica la retrotranslocación hacia proteasomas donde dichas proteínas son degradadas, lo que obviamente deriva en una baja en el rendimiento de la proteína recombinante. Cuando la acumulación de proteínas mal plegadas excede la capacidad del retículo endoplasmático, se activa un conjunto de señales celulares conocido como UPR, del inglés “*unfolded protein response*”. Este proceso, deriva en la regulación transcripcional de varios genes que están involucrados en el plegado de proteínas y ERAD. Estos procesos en conjunto limitan la secreción de proteínas recombinantes.

Por otro lado, las proteínas que se han plegado correctamente, pueden abandonar el retículo endoplásmico y dirigirse al aparato de Golgi siendo transportadas por vesículas. El transporte a lo largo del Golgi, y desde el Golgi a la membrana plasmática o apoplasto, es también un transporte mediado por vesículas, por lo que este tipo de transporte representa también un cuello de botella que puede derivar en una disminución de la cantidad de proteína secretada y limitar los rendimientos de producción. Proteínas con otros destinos como la vacuola, lisosomas o el retículo endoplásmico son direccionadas desde el aparato de Golgi. Este direccionamiento puede resultar impedido, provocando también una disminución en la proteína recombinante [102].

Estos cuellos de botella se encuentran esquematizados en la figura 2 y son generalmente procesos blanco de la ingeniería de células con el objetivo de facilitar el paso de la proteína de interés a lo largo de la vía secretoria [103]. En la tabla 4 se mencionan algunas estrategias de ingeniería genética que se han utilizado en sistemas de expresión basados en células animales; siendo algunas de ellas aplicadas en este trabajo de tesis con el objetivo de aumentar los rendimientos de producción de proteínas heterólogas en plantas.

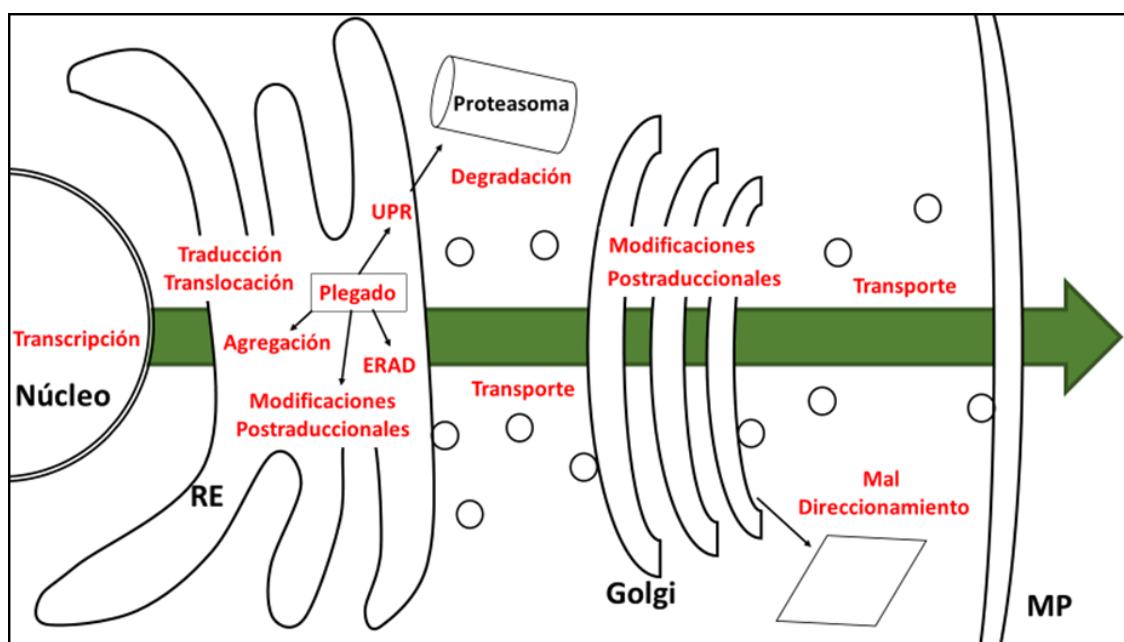


Figura 2: Cuellos de botella presentes en la síntesis, plegamiento y transporte de proteínas a lo largo de la vía secretoria de células eucariotas: transcripción y traducción del gen, ingreso al RE, plegamiento y formación de modificaciones postraduccionales con riesgo de formación de agregados y proteínas mal plegadas que pueden desencadenar en ERAD o UPR o ser degradadas en proteasomas. Transporte desde el RE al Golgi, otras modificaciones postraduccionales y transporte post-Golgi. RE: retículo endoplásmico. MP: membrana plasmática. Adaptado de Delic y col. 2014. [102].

Tabla 4: Estrategias de ingeniería genética aplicadas en células de animales para aumentar la producción de proteínas heterólogas (Adaptada de Zhou et al., 2018 [103]).

Estrategia de ingeniería genética	Genes blanco más comunes	Proceso afectado
Ingeniería del péptido señal y proteínas de reconocimiento	Secuencias señal, SRP.	Translocación del péptido naciente al lumen del RE.
Sobreexpresión de chaperonas	BiP, Calnexina, PDI	Plegado proteico en el RE
Ingeniería de la señal UPR	XBP1, ATF4, ATF6	Homeostasis y estrés del RE
Sobreexpresión de transportadores de vesículas	SNAP-23, VAMP8, CERT S132A	Transporte mediado por vesículas
Silenciamiento de reguladores negativos del transporte de vesículas	CerS2, Tbc1D20	Transporte mediado por vesículas
Ingeniería de los RNA pequeños	miR-7, miR-1287, mitosRNA-1978	Procesos diversos
Ingeniería del desarrollo de la vía secretoria	Blimp-1, XBP1	Crecimiento y diferenciación celular

3.1- Estrategias relacionadas con el plegado de proteínas.

El retículo endoplásmico (RE) es parte de un sistema de endomembranas que constituye, junto con otros componentes como el aparato de Golgi, vacuolas y la membrana plasmática; la vía secretoria. A lo largo de esta vía, se sintetizan la mayor parte de las proteínas de la célula vegetal y en general, la mayoría de las proteínas heterólogas de interés ya sea farmacéutico o industrial.

Las proteínas secretorias comienzan a sintetizarse en el retículo endoplásmico, donde adquieren su conformación nativa y son ensambladas antes de seguir su paso a lo largo de la vía secretoria. Debido a esta función, el RE está equipado con una gran cantidad de proteínas cuya función es asistir el plegado de nuevas proteínas secretorias.

Las proteínas que llegan al lumen del retículo endoplásmico, pueden tener 3 destinos posibles: pueden plegarse correctamente y seguir su camino a lo largo de la vía secretoria hacia su destino final; pueden fallar en su plegado y ser degradadas; o pueden formar agregados que son almacenados en el RE y se denominan cuerpos proteicos. En la mayoría de los sistemas de

expresión, la formación de estos agregados está asociada generalmente con situaciones de estrés o defectos genéticos y es tratado por la célula como una patología; pero en plantas, la formación de agregados es también una forma de almacenar proteínas en el RE durante algunos estadios del desarrollo. La asistencia en el plegado proteico y la degradación de proteínas mal plegadas, son dos grandes fenómenos que están interrelacionados y en conjunto se conocen como el control de calidad del retículo endoplasmático (ERQC, del inglés, *endoplasmic reticulum quality control*) [104].

Cuando se produce un aumento en la producción de proteínas secretorias o cuando el sistema de plegado de proteínas es defectuoso, pueden acumularse proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático que desencadenan un cuadro de estrés. Esta situación de estrés en el RE puede estar asociada a situaciones patológicas que producen dificultades en el plegado proteico, o a situaciones normales que producen un desbalance en la homeostasis del retículo endoplasmático. Durante la maduración de las semillas, por ejemplo, los tejidos de almacenamiento se desarrollan derivando en un incremento en la producción de proteínas secretorias, al igual que ocurre en la diferenciación de células plasmáticas en mamíferos. Estas situaciones generan respuestas que consisten en un conjunto de señales conocido como respuesta a proteínas mal plegadas o UPR.

Por lo expuesto anteriormente, el plegado proteico es un paso limitante en la síntesis de proteínas y es un proceso que se encuentra asistido por proteínas de la familia HSP (heat shock proteins), chaperonas y chaperoninas. Este sistema de chaperonas ha sido uno de los blancos de la ingeniería de células con el objetivo de aumentar la producción de proteínas de interés, intentando aumentar la capacidad de plegado proteico. Esta estrategia, ha demostrado ser exitosa en levaduras y células de mamíferos donde la sobreexpresión de chaperonas produce aumentos en la acumulación de la proteína de interés en un 50-400% [102], [105], sin embargo esta estrategia no ha sido empleada en plataformas basadas en plantas. En *Arabidopsis thaliana*, las proteínas residentes del RE más importantes y cuyo rol es asistir el plegado proteico son: BiP (Binding protein), Calnexina (CNX1), Calreticulina (CRT1) y la proteína-disulfuro isomerasa (PDI).

3.2- Estrategias relacionadas con la señal UPR.

La síntesis y degradación de proteínas son dos procesos altamente relacionados y que responden a un equilibrio que contribuye a la homeostasis en el retículo endoplasmático y que es censado por el control de calidad del RE.

La expresión de una proteína heteróloga puede ocasionar un desbalance en el retículo endoplasmático causado por una saturación de la capacidad de síntesis y plegado de proteínas [106]. Esta situación puede derivar en la acumulación de proteínas mal plegadas lo que desencadena la señal UPR.

La respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), se define como una vía de señalización intracelular cuya función es transmitir información acerca del plegado de proteínas en el RE, al citoplasma y al núcleo. Frente a situaciones de estrés en el retículo, UPR se activa con el objetivo de generar una respuesta adaptativa que le permita a la célula corregir defectos en el plegado de las proteínas. Como parte de esta respuesta, se encuentra la activación de los genes que codifican para chaperonas del retículo, incrementando de esta manera la asistencia de estas proteínas en el plegado de las proteínas de interés. Esta respuesta ha sido ampliamente estudiada en levaduras y mamíferos y en los últimos años, se han descrito los análogos correspondientes a plantas. Son procesos ampliamente conservados [107], encontrándose homólogos en los distintos sistemas, los cuales se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 5: Tansductores de la señal UPR en levaduras, animales y plantas:

Levaduras	Animales	Plantas
Ire1	Ire1	Ire1 a, b
Hac1	XBP1	bZIP60
--	ATF6	bZIP17/bZIP28

En situaciones normales, la proteína residente del retículo, BiP, interactúa con proteínas de membrana del RE que actúan como transductores de la señal UPR. Estas proteínas transmembrana son, en plantas, Ire1 y los factores de transcripción bZIP17 y bZIP28 y su mecanismo de acción se encuentra esquematizado en la figura 3.

La proteína Ire1, es una proteína transmembrana del retículo endoplasmático, cuyo extremo N-terminal posee un dominio sensor y se encuentra hacia el lumen del RE, mientras que su dominio citosólico C-terminal tiene actividad ribonucleasa. En condiciones normales, el dominio sensor de la proteína Ire1 se encuentra interactuando con la proteína BiP, en cambio, cuando se produce un desbalance en el retículo y se acumulan proteínas mal plegadas, BiP se libera para unirse a estos ligandos proteicos lo que desencadena la oligomerización y trans-autofosforilación de Ire1, activando su dominio ribonucleasa. Este dominio activo, lleva a cabo un proceso de *splicing* citoplasmático, reconociendo y catalizando el clivaje del mRNA codificante para el factor de transcripción bZIP60, ortólogo a XBP1, que cuenta con una estructura secundaria específica que consiste en dos *loops* consecutivos. Los fragmentos de este mRNA son ligados, dando lugar a un mRNA más corto, llamado *spliced* (bZIP60s). De esta manera, coexisten la versión completa y la versión *spliced* del mRNA, codificantes para los productos proteicos completo y truncado respectivamente. La versión truncada de bZIP60, denominada bZIP60 Δ C, tiene actividad de factor de transcripción, por lo que se transloca al núcleo activando la transcripción de genes UPR, entre los que se encuentra BiP [108].

Los factores de transcripción bZIP17 y bZIP28, ortólogos a ATF6 conforman un segundo sistema sensor de la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo. Ambos factores se encuentran unidos a BiP, y al igual que Ire1, son activados cuando BiP se libera para unirse con proteínas mal plegadas. Tanto bZIP17 como bZIP28 son proteínas transmembrana del retículo en condiciones normales, pero se translocan al Golgi en situaciones de estrés donde son clivados secuencialmente por dos proteasas: SP1 y SP2. De esta manera, se liberan sus dominios activadores, que al igual que bZIP60, pueden dirigirse al núcleo para actuar como factores de transcripción induciendo los genes UPR [108]. Además de la diferencia en el procesamiento, las características de los dominios bZIPs de estos factores difieren de las del bZIP60 [109], registrándose también respuestas celulares diferentes a partir de su activación. El factor bZIP17 se ha descrito principalmente como un factor de transcripción involucrado en la respuesta a estrés salino y osmótico [110], [111], mientras que el bZIP28 interviene en la UPR pudiendo activar esta señal por una vía distinta que la utilizada por el bZIP60 [112]. También se ha descrito que tanto el bZIP17 como el bZIP28 podrían también participar en procesos de crecimiento celular y proliferación como la elongación de las raíces [113], por lo que participarían de una señal UPR diferente de la convencional gobernada por el bZIP60, cuya función está más relacionada con mantener la expresión de genes vinculados al crecimiento celular que con la homeostasis en el retículo [114].

La sobreexpresión de los factores de transcripción del tipo bZIP mencionados en sus formas completa o truncada, ha sido una estrategia estudiada en plantas con el objetivo de sobrellevar distintos cuadros de estrés, confirmando a las plantas respuestas adaptativas que mejoran su crecimiento en situaciones de sequía o estrés salino entre otros [115]-[118]. Sin embargo, no se ha utilizado a estos factores bZIP en estrategias de ingeniería con el objetivo de aumentar la sobreexpresión de proteínas como sí se ha hecho con sus ortólogos en levaduras y animales [105], [119], [120].

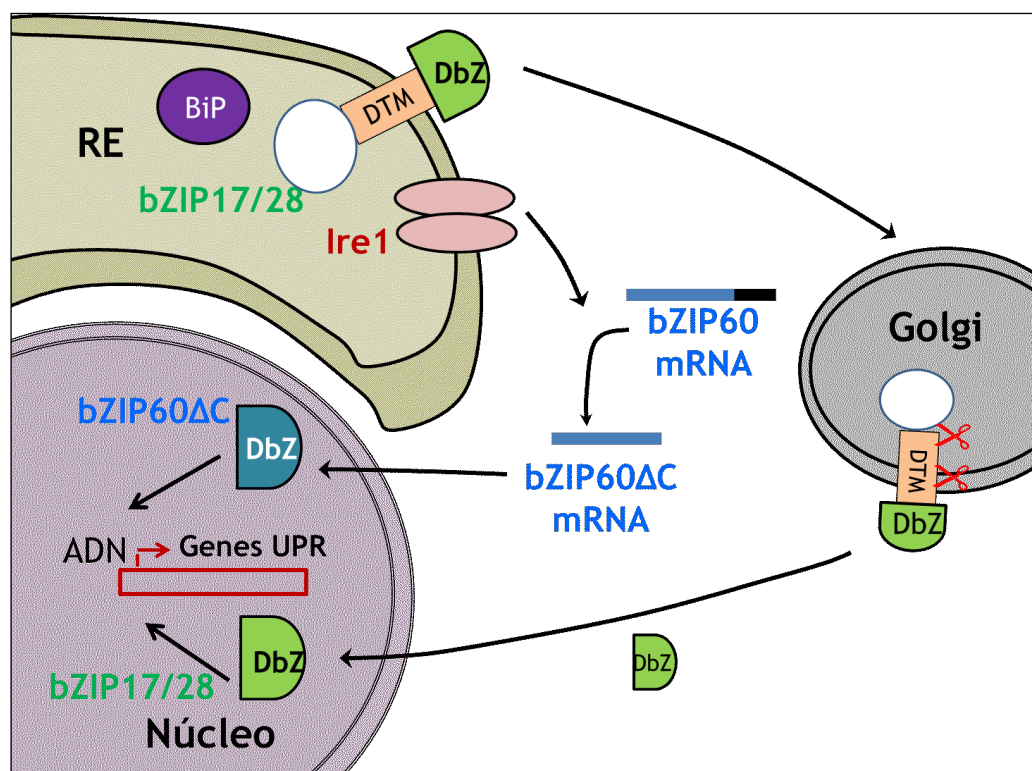


Figura 3: Representación esquemática del mecanismo de acción de los factores bZIP en la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) en *Arabidopsis thaliana*. En condiciones normales, Ire1 y los factores bZIP17 y bZIP28 se encuentran anclados a la membrana del retículo endoplasmático (RE). Cuando se desencadena UPR, estas proteínas de membrana actúan como transductores de señal. Por un lado, Ire1 se activa, provocando un splicing citoplasmático del ARN mensajero que codifica para el bZIP60, dando un ARN más corto que da lugar al factor bZIP60 truncado (bZIP60ΔC) que contiene al dominio bZIP (DbZ) que incluye el dominio de unión al ADN para inducir la expresión de genes UPR. Por otro lado, los factores bZIP17/28 se translocan al Golgi donde son clivados, liberándose su dominio bZIP (DbZ) que puede ingresar al núcleo para también activar genes UPR. DTM: dominio transmembrana.

3.3- Estrategias vinculadas al desarrollo de la vía secretoria.

Existen pocos ejemplos de células que tienen muy desarrollada la vía secretoria y son aquellas especializadas en la secreción de proteínas como por ejemplo las células de glándulas exocrinas (por ejemplo, el páncreas), células plasmáticas que producen anticuerpos y las células de semillas en desarrollo que sintetizan proteínas de reserva y triglicéridos.

En el caso de las células plasmáticas, la diferenciación de las células B en células secretorias profesionales involucra una serie de procesos que se detallan en la figura 4 que no solo involucran el desarrollo de la vía secretoria sino también una activación del metabolismo celular para hacer frente a la mayor demanda energética y la activación constitutiva de la señal UPR [121]. Este proceso de diferenciación implica cambios en la expresión de cientos de genes, donde se silencian genes asociados al fenotipo de células B (como *pax5*, *bach2* y *bcl6*) y se activan genes específicos de células plasmáticas. En este proceso se han descrito dos factores clave en mamíferos: Blimp-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein) y XBP1 (X-box binding protein I) [122].

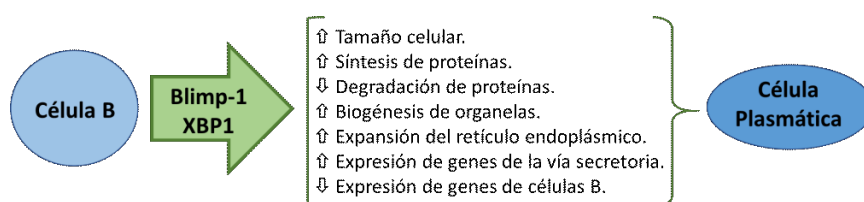


Figura 4: Procesos que son activados e inactivados durante la diferenciación de células B en células plasmáticas por la acción de los factores de transcripción Blimp-1 y XBP1 en mamíferos.

Blimp-1 es un factor de transcripción determinante y suficiente en la diferenciación de células B a células plasmáticas y para la secreción normal de inmunoglobulinas por parte de estas células. Este factor, posee varios elementos funcionales en su estructura: una región rica en prolinas, 5 motivos tipo “dedo de Zinc” de unión al DNA [123] y residuos ácidos en su carboxilo terminal que podrían actuar como transactivadores [124], [125]. Hasta el momento, se ha identificado a este factor como un represor transcripcional de genes específicos de las células B cuyo mecanismo de acción podría estar relacionado con el reclutamiento de otras proteínas represoras o complejos modificadores de histonas para crear una estructura de la cromatina más compacta. Estudios de inactivación del gen que codifica para Blimp-1, han demostrado que este factor de transcripción tiene un rol en la inactivación de las funciones de las células B (como por ejemplo el reconocimiento de patógenos o la presentación de antígenos), en la adaptación a la función secretoria de las células plasmáticas aumentando su actividad metabólica y conservando su morfología y organización citoplasmática y controla la secreción de inmunoglobulinas. Además, se ha descrito que Blimp-1 regula la respuesta a proteínas mal plegadas, ya que su inactivación produce una disminución en la expresión de XBP1, ATF6 y ATF4 descritos anteriormente como los transductores de la señal UPR, y de proteínas del RE que asisten el plegado proteico [126].

XBP1, tal como se describió anteriormente, es un factor de transcripción del tipo bZIP ortólogo al bZIP60 descrito en *Arabidopsis thaliana*. Este factor, desencadena la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) a través de un mecanismo de splicing citoplasmático donde su RNA mensajero es procesado por Ire1 para dar un transcrito más corto, codificante para la forma activa de XBP1 que ingresa al núcleo regulando la expresión de genes involucrados en la síntesis y plegado de proteínas. En mamíferos, durante el proceso de diferenciación de células plasmáticas la expresión de XBP1 es regulada por Blimp-1, contexto en el cual la respuesta UPR no se activa por una situación de estrés, sino por una necesidad fisiológica que acompaña a la expansión del RE necesaria para la gran secreción de proteínas de las células plasmáticas. XBP1 produce un aumento del tamaño celular y del contenido del RE, aumentando la síntesis de proteínas, lo cual indica que no es solo un transductor de la señal UPR sino que también es un regulador clave para alcanzar el fenotipo de “células secretorias profesionales” [126]-[128]. Aunque el mecanismo de activación de XBP1 por parte de Blimp-1 no se ha dilucidado directamente, la expresión de XBP1 disminuye notablemente en ausencia de Blimp-1 y se ha demostrado que Blimp-1 reprime la expresión de BSAP/PAX5, un represor de XBP1, lo cual daría indicios del mecanismo de regulación de estos factores de transcripción [128].

Teniendo en cuenta el rol de estos factores de transcripción en el desarrollo de células secretorias modelo como son las células plasmáticas, se ha propuesto la utilización de XBP1 como estrategia de ingeniería para mejorar los niveles de producción de proteínas secretorias en células animales o de su ortólogo Hac1 en levaduras [103], [105], [129], [130]. Sin embargo, esta estrategia no se ha probado en plantas [131]-[133]. En el presente trabajo se plantea estudiar el efecto de la sobreexpresión del ortólogo de plantas de XBP1, el factor de transcripción bZIP60 y otros transductores de la señal UPR con el fin de aumentar el rendimiento de proteínas recombinantes en *Nicotiana benthamiana*.

HIPÓTESIS



Este trabajo de tesis pretende contribuir al conocimiento de las plantas como fábricas de proteínas recombinantes y se basó en dos grandes hipótesis.

La primera hipótesis planteada fue que la utilización de iluminación LED *Full Spectrum* o Rojo-Azul permitiría alcanzar mayores rendimientos de proteína recombinante. Este tipo de iluminación se caracteriza por su alta eficiencia, larga vida útil, flexibilidad de espectro, tamaño pequeño, etc., por lo que en los últimos años fábricas de plantas que utilizan este tipo de iluminación se han instalado en varios países para producir productos hortícolas de características más controladas. Además, son una alternativa que responde a los problemas globales que enfrenta el planeta, incluyendo la crisis energética, las limitaciones en el área de tierra cultivable y de las reservas de agua; siendo un sistema de iluminación más seguro para la producción y amigable con el medio ambiente. En el área de producción proteínas recombinantes hay escasa información que sea de conocimiento público sobre este tema ya que aunque algunas fábricas de gran capacidad han sido instaladas, éstas forman parte del *know how* de las empresas. Además la tecnología LED se encuentra en expansión y continuamente aparecen nuevos productos.

La segunda gran hipótesis es que la producción de proteínas heterólogas en células vegetales se encuentra limitada por la capacidad de plegamiento y transporte en la vía secretoria. La mayor parte de las proteínas con aplicaciones terapéuticas, en medicina regenerativa, en cosmética o industriales requieren de un procesamiento co- y/o post-traducciona que es propio de la vía secretoria. En otros sistemas de expresión, se han utilizado estrategias de ingeniería de esta vía con el fin de mejorar los rendimientos de producción de proteínas heterólogas, como por ejemplo, la expresión de reguladores clave como XBP1 en mamíferos y Hac1 en levaduras que controlan la diferenciación celular de células secretorias profesionales. Sin embargo, en los sistemas de expresión basados en plantas estas estrategias no han sido utilizadas. Las células de semillas en desarrollo cuentan con una vía secretoria ampliamente desarrollada coherente con la gran cantidad de moléculas que sintetizan, por lo que son comparables con otras células secretorias profesionales como por ejemplo las células plasmáticas de mamíferos. En base a esto, se plantea que la expresión de ortólogos de XBP1 u otros reguladores claves, cuyos niveles de expresión se incrementan en semillas en desarrollo, podrían ser de utilidad para incrementar la síntesis de proteínas foráneas en hojas.

OBJETIVOS



De acuerdo a las hipótesis planteadas, el objetivo general de este trabajo fue estudiar diferentes estrategias para mejorar la producción de proteínas recombinantes empleando sistemas de expresión temporal. Por un lado, planteamos analizar el impacto de la iluminación LED en el desarrollo y capacidad de producción de proteínas de plantas de *Nicotiana benthamiana*. Por otro lado, se planteó explorar estrategias de ingeniería de la vía secretoria que han resultado exitosas en otros sistemas de expresión estudiando el efecto de moléculas que actúen en distintos niveles, regulando el desarrollo de la vía secretoria o el plegamiento de proteínas.

Objetivos específicos

- 1) Estudiar el efecto de la iluminación LED *Full Spectrum* y Rojo-Azul sobre el crecimiento, desarrollo y la producción de proteínas heterólogas de plantas *Nicotiana benthamiana*.
- 2) Analizar el impacto del factor de transcripción AtbZIP60, que es el ortólogo de XBP1 en células de mamíferos y de Hac1 en levaduras, en la producción de proteínas reporteras dirigidas al retículo endoplásmico.
- 3) Analizar el impacto de los factores de transcripción AtbZIP17 y AtbbZIP28, ortólogos de ATF6 de mamíferos, en la producción de proteínas reporteras dirigidas al retículo endoplásmico.
- 4) Evaluar el impacto de la chaperona Calnexina1 en la producción de proteínas reporteras dirigidas al retículo endoplásmico.
- 5) Estudiar el impacto de los factores AtbZIP y Calnexina1 en la síntesis de moléculas altamente demandantes en el plegado y transporte como son las inmunoglobulinas completas y los anticuerpos simple cadena.

RESULTADOS



Efecto de las condiciones de luz sobre el crecimiento y producción de proteínas heterólogas de plantas *Nicotiana benthamiana*.

Según el primer objetivo planteado en este trabajo, se analizó el efecto de la calidad y cantidad de luz sobre el crecimiento y desarrollo de plantas *Nicotiana benthamiana*. Estas plantas fueron crecidas en cuarto de cultivo a 22°C de temperatura y 70% de humedad, con un fotoperíodo de 16:8 horas (luz-oscuridad) bajo tres condiciones de luz diferentes: tubos fluorescentes blanco frío, chips LED *Full Spectrum*, y una combinación de chips LED rojos (620-630nm) y azules (460-470nm) en relación 2:1. Las características técnicas de estas luces se presentan en la tabla 6 y los espectros de luz en la figura 5. Todas estas fuentes lumínicas presentan un espectro diferente de la radiación solar y en el caso de los LED se intenta maximizar la emisión de luz en las longitudes de onda en las que absorbe la clorofila. La figura 6 muestra un esquema que ilustra la disposición de estas luces en los estantes utilizados para el crecimiento de las plantas con fotos de cada condición de luz. Se instalaron 5 tubos fluorescentes por estante que se dispusieron paralelamente a lo ancho del mismo mientras que en el caso de las luces LED tanto *Full Spectrum* como Rojo-Azul se dispusieron 9 luces en el centro del estante con un disipador de calor.

Tabla 6: Fuentes de iluminación utilizadas.

Característica	Tubos Fluorescentes	LED <i>Full Spectrum</i>	LED Rojo	LED Azul
Marca	Osram	Epistar	Epistar	Epistar
Denominación	T8 Blanco frío 120cm	Genérico COB <i>Full Spectrum</i>	Genérico COB High Power Rojo	Genérico COB High Power Azul
Potencia (W)	36	10	10	10
Corriente máxima (mA) (1)	---	900	900	900
Angulo del haz (2)	180°	120°	120°	120°
Long. de onda (nm)	400-800	400-840	620-630	460-470
Flujo luminoso (lúmenes)	2500	900-1000	270-350	100-150
Intensidad de luz (lux) (3)	1591,55	1273,24	445,63	190,99
DFFF teórica para 1 luz a 50cm ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) (4)	21,47	32,71	34,25	22,07
DFFF teórica para 1 estante a 50cm ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) (5)	107,35	294,39	271,71	
Potencia eléctrica por estante (W)	180	90	90	

(1) Se trabajó a 800mA. (2) Aunque para los tubos fluorescentes el ángulo de haz es de 360°, se utilizó un ángulo de 180° para los cálculos, ya que parte de la luz es emitida hacia el estante superior y no hacia las plantas. (3) Cálculo teórico para 1 única lámpara o chip, considerando el flujo lumínico medio a 900mA a 50 cm de la fuente de luz: Intensidad de luz (lux) = (Flujo luminoso (lumen) / Ángulo sólido) / distancia al cuadrado. (<http://www.lumora.es/files/Info%20Led/Convertor%20de%20Lumen%20a%20Lux.xlsx>) (4) DFFF = Densidad de flujo fotónico fotosintético. Los valores fueron obtenidos con el conversor online disponible en <https://www.waveformlighting.com/horticulture/> considerando la longitud de onda de cada tipo de luz. Para los LED *Full Spectrum* se utilizó la conversión para LED 450+650+3500 (Azul+Rojo+Blanco) (5) Los estantes poseen 5 tubos fluorescentes, 9 LED full Spectrum o 6 LED Rojos + 3 LED Azules.

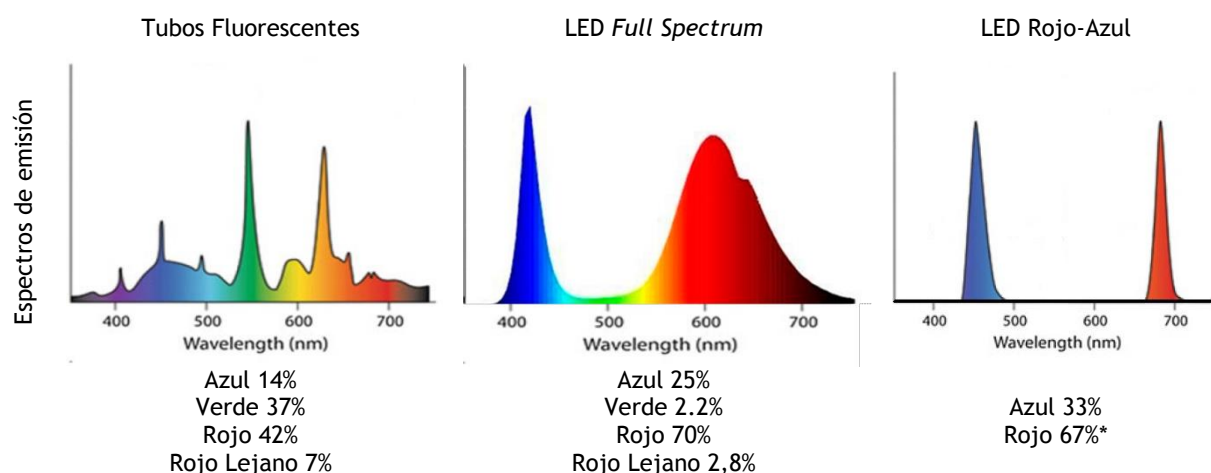


Figura 5: Espectros de emisión de cada una de las fuentes de luz estudiadas. Adaptado de Dutta Gupta (2017) [134]. * El espectro mostrado corresponde a una relación rojo:azul 1:1 pero el trabajo se realizó con una relación 2:1.

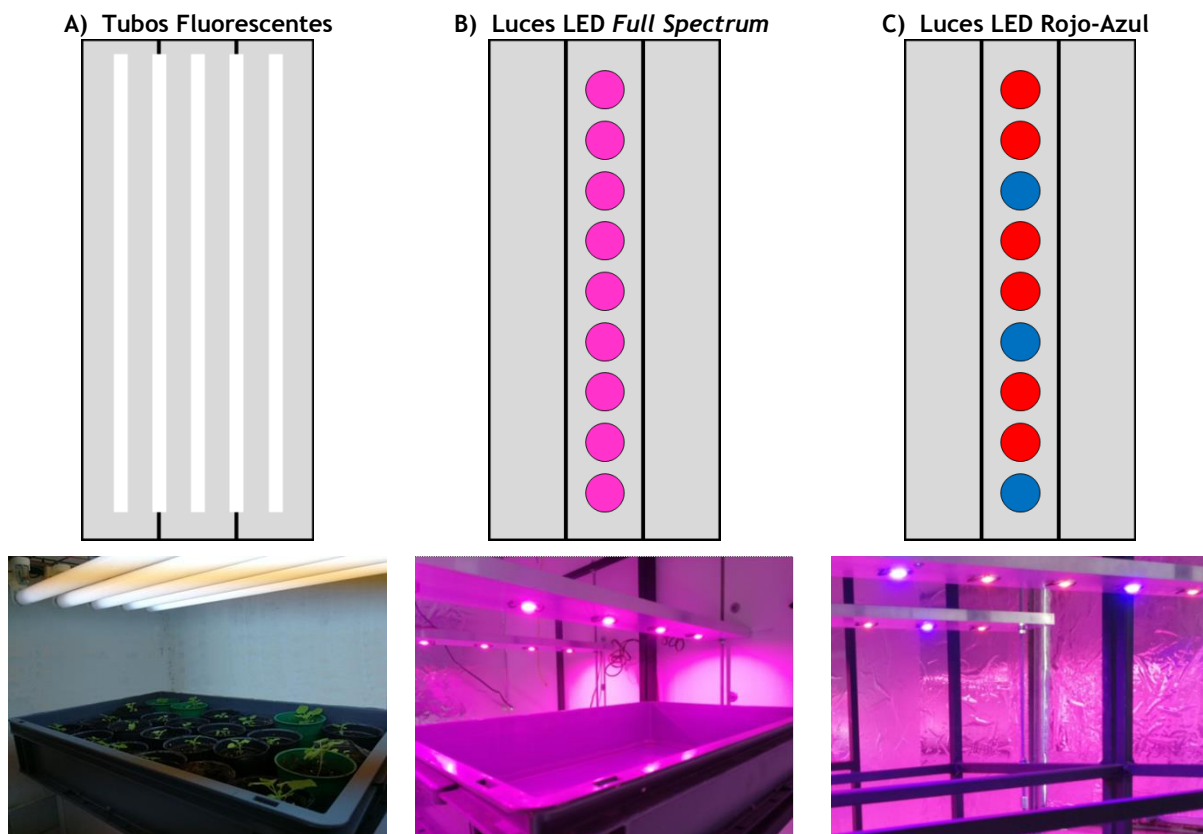


Figura 6: Disposición de las luces sobre los estantes destinados para el crecimiento de las plantas *Nicotiana benthamiana* utilizadas en este trabajo. En la parte superior se muestra un esquema que representa la disposición de las distintas fuentes de luz sobre los estantes, representados en gris, desde una vista superior. Para el caso de los tubos fluorescentes (A) representados con líneas blancas, se instalaron 5 tubos distribuidos uniformemente a lo ancho de los estantes. En el caso de las luces LED, representadas con círculos de color, se instalaron 9 luces a lo largo del centro de cada estante, tanto para las luces LED *Full Spectrum* (B), como para las luces LED Rojo-Azul (C). Debajo de cada esquema se muestra una foto de la instalación de cada tipo de luz.

Las semillas de *Nicotiana benthamiana* fueron germinadas y crecidas durante una semana bajo las mismas condiciones. Luego fueron trasplantadas a macetas de 9cm de diámetro, momento a partir del cual fueron crecidas en las distintas condiciones estudiadas.

Para evaluar las distintas condiciones de luz, se determinó la densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF ó PPFd del inglés photosynthetic photon flux density) empleando un sensor de radiación fotosintéticamente activa (Photosynthetic Active Radiation, PAR -Cavadevices, Argentina-). Las medidas se realizaron a dos distancias diferentes de la fuente de luz: 17cm que es la distancia correspondiente a la base de las plantas, que coincide con el nivel superior del sustrato en cada maceta individual y a 13cm que es la distancia promedio a la que se encuentra la tercer o cuarta hoja de las plantas *Nicotiana benthamiana* crecidas en los estantes. Para cada distancia, se midió la DFFF en 15 puntos diferentes del plano xy delimitado por dichos estantes, 3 puntos distribuidos a lo ancho de cada estante (x) y 5 puntos distribuidos a lo largo del estante (y). La figura 7 muestra un esquema que representa la bandeja contenedora de las plantas y los distintos puntos de medida de la intensidad de luz.

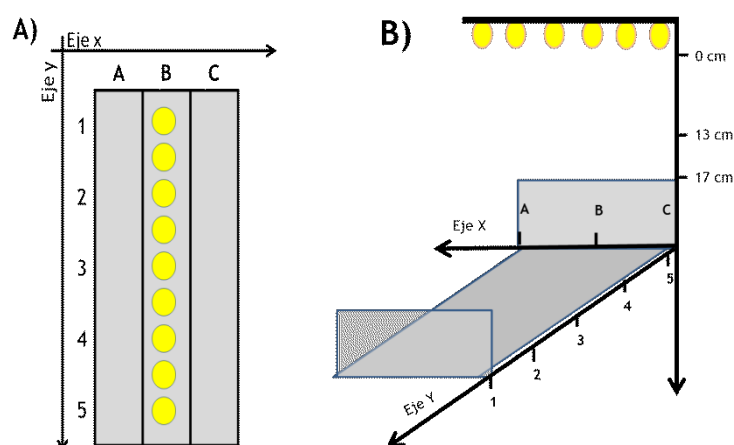


Figura 7: Representación esquemática de los puntos de medida para la determinación de intensidad de luz. La figura muestra dos esquemas de los estantes de la cámara de cultivo que sostendrán a las plantas (representados en gris) y su ubicación respecto de la fuente de luz (círculos amarillos). En la figura 7A se muestra el esquema de un estante, visto desde arriba, mientras que en la figura 7B se muestra una representación tridimensional de los estantes y su distancia con respecto a la luz. Se realizaron medidas de intensidad de luz en 15 puntos diferentes a lo largo del plano xy que se señalan con letras y números y a dos distancias diferentes de la fuente de luz: 13 y 17cm.

La figura 8 muestra gráficos que representan los resultados de las medidas de la DFFF realizadas a lo largo de los estantes, para cada fuente de luz ensayada. Los resultados de las medidas realizadas, revelaron que la mayor densidad de flujo fotónico fotosintético, es alcanzada con las luces LED *Full Spectrum*, llegando a valores de $148\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ a 17cm de las luces y $225\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ a 13cm de las luces. Los tubos fluorescentes, registraron valores de $130\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y $135\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ a 17 y 13cm de la luz respectivamente. En este caso, la variación de la radiación PAR con la distancia es muy pequeña, pudiendo inferir que dentro del rango analizado en este ensayo, la distancia a la fuente de luz no sería una variable de importancia para las plantas crecidas bajo este tipo de luz. La menor densidad de flujo fotónico fotosintético fue registrada para las luces LED Rojo-Azul, alcanzándose un valor promedio de $65\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ a la menor distancia ensayada, 13cm de la fuente de luz. Los valores de DFFF medidas difieren de los calculados teniendo en cuenta las especificaciones técnicas (tabla 6). En el caso de los tubos fluorescentes esto puede deberse a que los cálculos teóricos para esta fuente de luz se realizaron sin tener en cuenta que la luz emitida por los tubos en dirección opuesta a las plantas es reflejada hacia ellas, aumentando los valores de DFFF medidos. En el caso de las luces LED, en particular los rojos y azules muestran que la eficiencia lumínica es inferior a la declarada por el fabricante. Las DFFF obtenidas con los tubos fluorescentes y LED *Full Spectrum* son comparables a los valores que habitualmente se utilizan para los ensayos de expresión temporal: $80\text{-}100\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ [135], $100\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ [136], $130\text{-}150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ [137]-[139], $160\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ [140]. Estos valores están por debajo del máximo de fotosíntesis que se logra a un nivel de PAR de $200\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ [34]. Los valores de DFFF obtenidos para las luces LED rojas y azules son inferiores a los requeridos, sin embargo es importante recalcar que estas luces emiten en las longitudes de onda en las que las plantas poseen mayor absorción. Las determinaciones de radiación PAR mostraron una disminución hacia los extremos del eje y para todas las luces, lo cual es lógico ya que coincide con los extremos de las luces. Además, estas medidas mostraron que la distribución de la luz es más homogénea en los estantes con tubos fluorescentes, manteniéndose aproximadamente constantes hacia el centro del estante y sin mayor variación a lo largo del plano xy. Estos datos indican que existe iluminación cruzada entre los tubos de manera que es posible mantener la intensidad de luz constante en los espacios entre tubos, a lo largo del eje x. Sin embargo, esto no fue así para las luces LED, ni *Full Spectrum* ni Rojo-Azul, registrándose los valores máximos hacia el centro del estante, justo debajo de las luces y valores entre un 80-90% menores hacia los extremos a lo largo del eje x. Estos datos no coinciden con los datos del fabricante, que informan un ángulo de 120° (tabla 6) lo que a una distancia de 20cm permitiría cubrir un diámetro de 70cm.

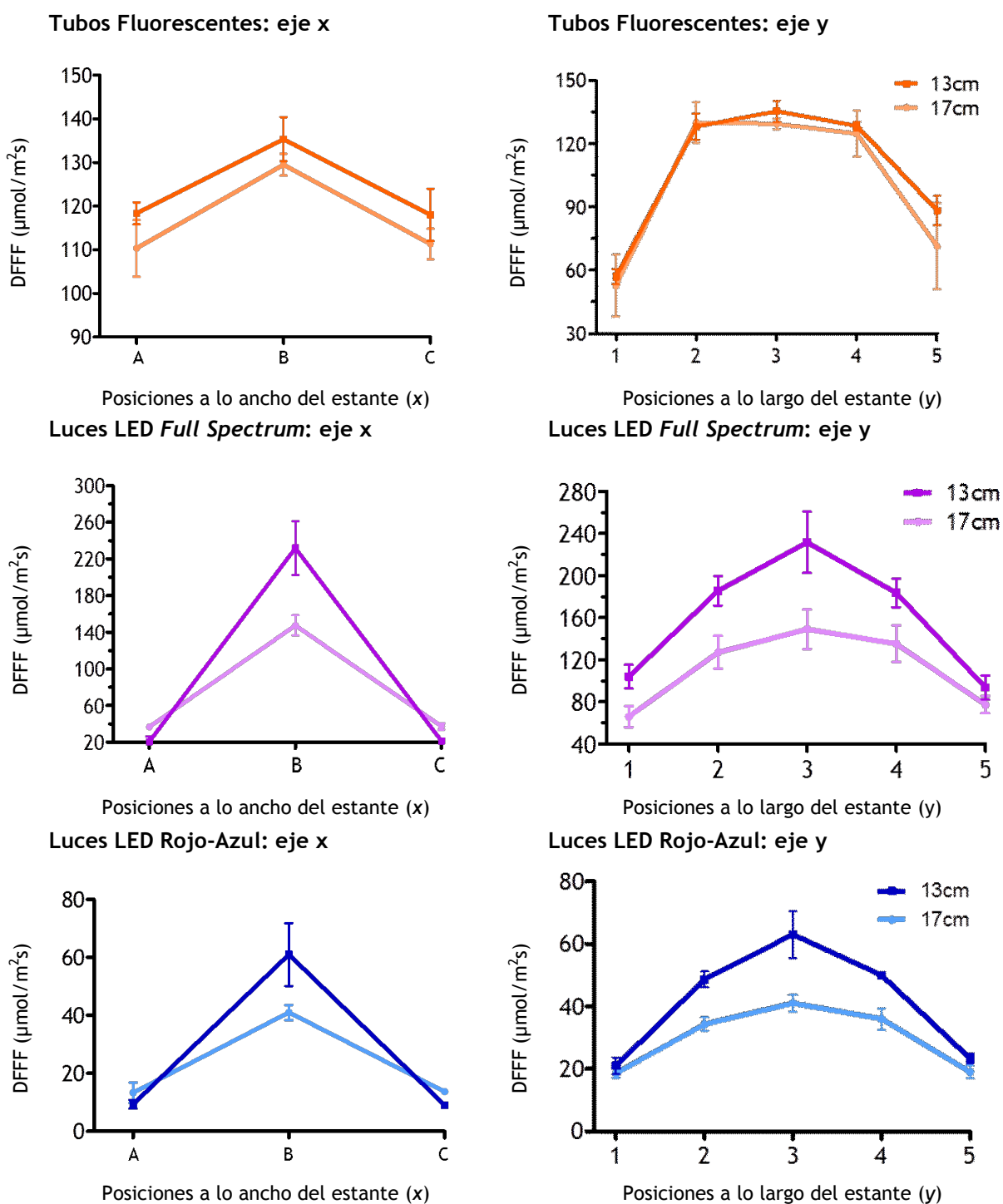
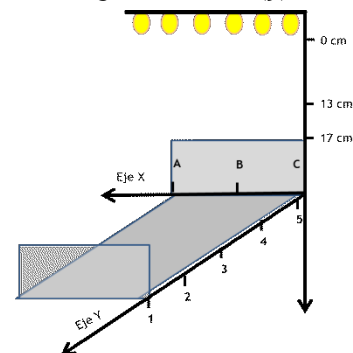


Figura 8: Densidad del flujo fotónico fotosintético (DFFF) para las distintas fuentes de luz estudiadas. Se determinó la DFFF en $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ para los tubos fluorescentes (panel superior), luces LED *Full Spectrum* (panel intermedio) y luces LED Rojo-Azul (panel inferior). Las medidas se realizaron a 2 distancias diferentes de la fuente de luz, 13 y 17cm, tal como lo indica la referencia de cada figura. Para cada distancia se realizaron medidas en 15 puntos diferentes del plano xy que representa los estantes de las plantas tal como se muestra en la figura 7. Se tomaron 3 puntos a lo ancho (x) y 5 puntos a lo largo del estante (y). A partir de estos gráficos se puede observar que la mayor intensidad de luz se alcanza con las luces LED *Full Spectrum*, superándose los $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ hacia el centro del estante. También se puede apreciar el efecto de la posición sobre los valores de intensidad de luz, donde hacia el centro del estante la DFFF es mayor, existiendo menor variación para los tubos fluorescentes.



Teniendo en cuenta las medidas de radiación PAR realizadas y con la finalidad de trabajar a la misma densidad de flujo fotónico fotosintético, que se estableció en $150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ como mínimo (a nivel del sustrato, en la base de las plantas) se ajustó la distancia a la que colocaron las plantas acercándolas a la fuente de luz para el caso de los tubos fluorescentes. En el caso de las luces LED Rojo-Azul, esto no fue posible ya que para alcanzar dicho valor, las plantas deberían haber estado demasiado cerca de la fuente de luz donde aumentaba la temperatura y no tenían espacio suficiente para desarrollarse en altura. Para esta condición de luz los estantes se mantuvieron a igual distancia de la fuente de luz que las luces LED *Full Spectrum*.

Efecto de las condiciones de luz sobre el crecimiento de plantas *Nicotiana benthamiana*.

Se procedió a evaluar el crecimiento y estado fisiológico de las plantas crecidas bajo las distintas fuentes de luz. Para ello, plantas de *Nicotiana benthamiana* se crecieron durante 4 semanas y luego se evaluaron distintos parámetros para analizar el crecimiento de las mismas y su estado fisiológico. La figura 9 muestra fotos de plantas crecidas en cada condición de luz y la tabla 7, muestra los resultados obtenidos de este análisis donde se determinó la altura promedio de las plantas, el número de hojas, el tamaño promedio de la tercer o cuarta hoja, el color de las hojas, y el contenido relativo de agua.

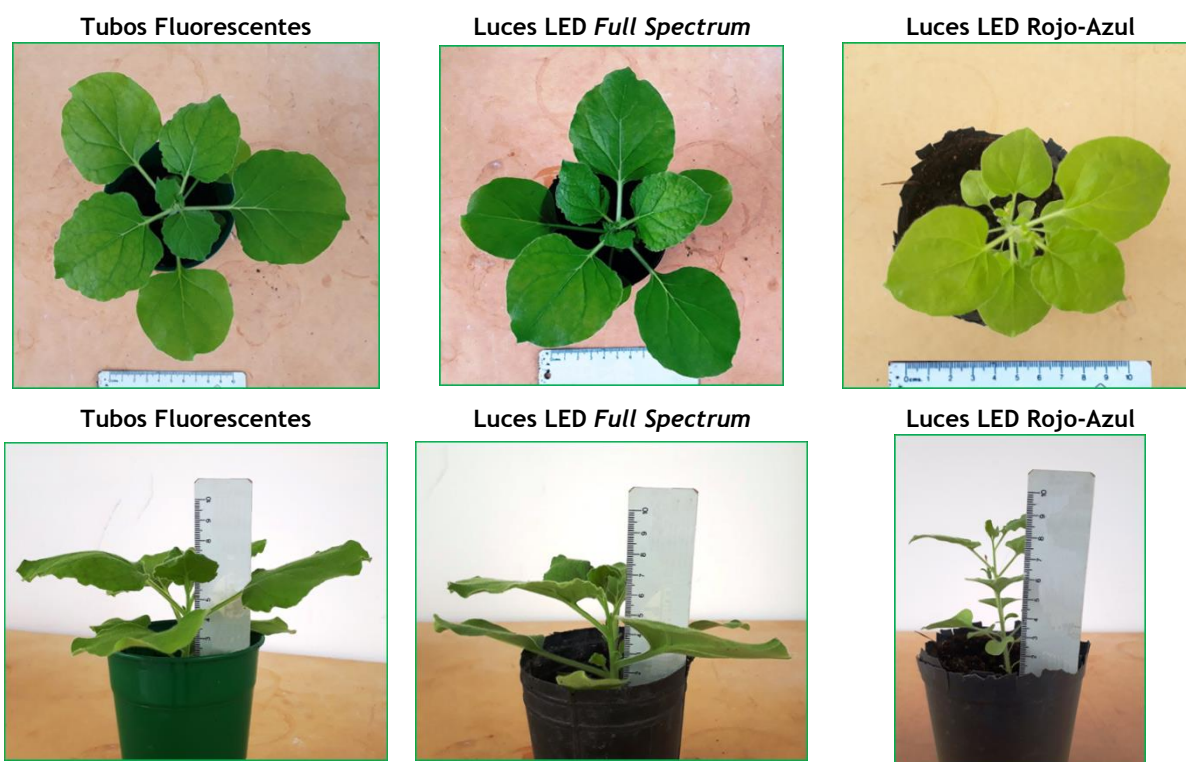


Figura 9: Fenotipo de las plantas *Nicotiana benthamiana* crecidas en las distintas condiciones de iluminación. Se evaluaron diferentes parámetros de crecimiento en plantas *Nicotiana benthamiana* de 4 semanas crecidas bajo distintas condiciones de luz: tubos fluorescentes, luces LED *Full Spectrum* y luces LED Rojo-Azul. En el panel superior se muestran fotos de las plantas desde una vista superior donde puede observarse el tamaño de las plantas y sus hojas. En el panel inferior, se muestran fotos de las plantas desde un plano lateral, pudiéndose observar la altura de las plantas. Las plantas crecidas bajo las luces LED Rojo-Azul, presentaron un color verde claro, amarillento, menor crecimiento lateral y menor desarrollo foliar con respecto a las otras plantas.

Tabla 7: Parámetros de crecimiento y fisiológicos evaluados para plantas *N. benthamiana* de 4 semanas crecidas bajo distintas condiciones de luz.

Parámetro	Tubos Fluorescentes	Luces LED Full Spectrum	Luces LED Rojo-Azul
DFFF medida ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)*	155 \pm 5	190 \pm 40	50 \pm 10
Altura promedio	8,0 \pm 1,1cm	7,8 \pm 0,5cm	9,8 \pm 1,8cm
Número de hojas promedio	8 \pm 1	8 \pm 2	7 \pm 2
Diámetro promedio de la 3ra o 4ta hoja	6,8 \pm 1,3cm	7,5 \pm 1,2cm	3,4 \pm 1cm
Color de la hoja	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde claro, amarillento
Contenido relativo de agua (CRA)**	97,5 \pm 3,4%	94,9 \pm 1,6%	---

*Se refiere al rango de DFFF medido para cada condición de luz una vez ajustada la mínima DFFF en 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

**Según análisis estadístico por una prueba t de Student, los valores de CRA no son significativamente diferentes entre sí (n=6). Por cuestiones técnicas el CRA no pudo determinarse para la condición de luz LED Rojo-Azul.

El análisis de parámetros relacionados con el crecimiento de las plantas reveló resultados similares para las condiciones de luz de tubos fluorescentes y luces LED *Full Spectrum*. Bajo estas condiciones de luz, las plantas mostraron el mismo color verde intenso, una altura promedio cercana a los 8cm y hojas grandes con un diámetro promedio de aproximadamente 7cm que sobresalen de la línea de la maceta, tal como se puede ver en la figura 9. Para el caso de las luces LED Rojo-Azul en cambio, las plantas crecidas bajo este tipo de luz mostraron mayor altura, hojas más pequeñas y de color más amarillento y hasta incluso presentaron algunos botones florales.

También se evaluó el contenido relativo de agua (CRA) de las plantas crecidas bajo las distintas luces. Los valores registrados de este parámetro fueron mayores a 90% y no mostraron diferencias significativas para las distintas condiciones de luz, tal como se indica en la tabla 7, lo cual coincide con el fenotipo saludable observado para estas plantas. Hubiera sido realmente interesante poder determinar el CRA para plantas crecidas bajo las luces LED Rojo-Azul, pero lamentablemente estas luces se quemaron antes de que se pudieran hacer estas medidas.

Los resultados obtenidos en esta sección indicarían que la mejor condición para el crecimiento de las plantas serían los tubos fluorescentes o las luces LED *Full Spectrum*. Bajo estas luces es que se registraron los mayores niveles de radiación fotosintéticamente activa y las plantas presentaron condiciones fisiológicas similares y desarrollaron hojas de gran tamaño, lo que implica mayor biomasa disponible para la producción de proteínas.

Efecto de la fuente de iluminación sobre la expresión de genes reporteros en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Para estudiar el efecto de las distintas condiciones de luz sobre los niveles de expresión de genes reporteros, se desarrollaron ensayos de expresión transitoria por agroinfiltración de hojas de plantas *Nicotiana benthamiana* crecidas durante 4 semanas bajo las distintas condiciones de luz estudiadas. Las proteínas reporteras utilizadas en esta sección fueron la enzima β -glucuronidasa (RE-GUS) y la proteína fluorescente verde (RE-GFP), codificadas por las construcciones de cDNA detalladas en Petruccelli et al. (2007), [141], y que son retenidas en el retículo endoplásmico por la señal KDEL en su extremo C-terminal [82]. Ambas proteínas reporteras son de síntesis y plegado sencillos y son fácilmente detectables por determinación de actividad enzimática o inmunoensayo. Las distintas construcciones de cDNA fueron subclonadas en un vector binario. Dichos vectores fueron luego introducidos en *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, para finalmente transformar hojas de *Nicotiana benthamiana* por agroinfiltración.

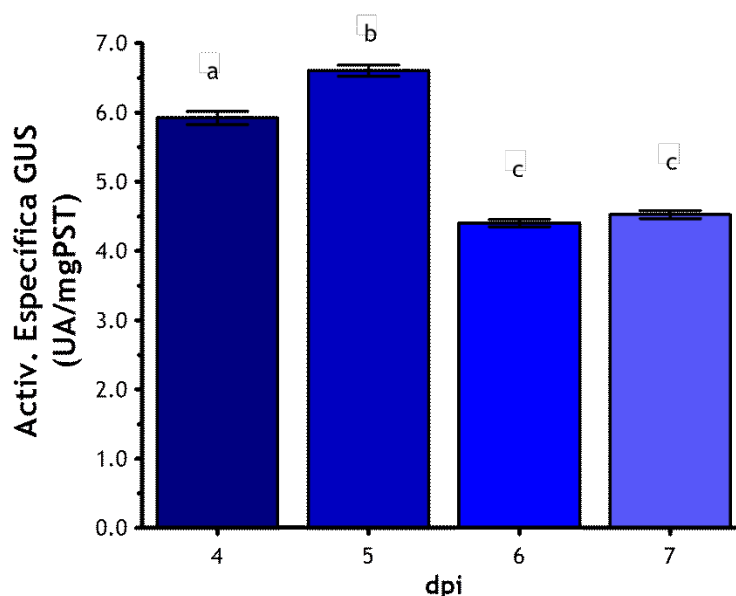
Efecto de las condiciones de luz sobre la expresión del gen reportero β -glucuronidasa en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Antes de evaluar el efecto de las condiciones de luz sobre los niveles de acumulación de la enzima β -glucuronidasa, se realizó una cinética de expresión con el objetivo de determinar el tiempo óptimo postinfiltración para realizar la cosecha de las muestras. Para esto, se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con una suspensión de células de *A. tumefaciens* conteniendo la construcción para RE-GUS, cuya concentración de agrobacterias fue ajustada a una $DO_{600}=0,4$. Se realizaron extractos a los 4, 5, 6 y 7 días postinfiltración (dpi) utilizando las condiciones óptimas de extracción detalladas en el Anexo I. Una vez realizados los extractos, se determinó la actividad de la enzima β -glucuronidasa por ensayo fluorométrico utilizando 4-metil-umbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) como sustrato (Materiales y Métodos), utilizando la misma cantidad de proteína soluble total (PST) para cada muestra.

Los resultados de la cinética de expresión de la enzima β -glucuronidasa se muestran en la figura 10, donde se puede ver que el máximo nivel de actividad de la enzima GUS se alcanzó al cabo de cinco días luego de la agroinfiltración disminuyendo a partir del sexto día. A partir de estos resultados, las muestras de hojas transformadas con RE-GUS serán cosechadas al quinto día postinfiltración.

Figura 10: Cinética de expresión del gen reportero β -glucuronidasa. Se analizó la actividad enzimática GUS presente en extractos de hojas cosechadas a los 4, 5, 6 y 7 días post infiltración (dpi). La mejor condición para este ensayo es la de 5 dpi, momento en el que se obtienen mayores niveles de actividad GUS.

Las barras representan la actividad específica de GUS expresada en unidades arbitrarias (UA) definidas como las unidades de fluorescencia generadas en 1 minuto, por 1mg de proteína soluble total (PST). Este ensayo fue realizado por quintuplicado, las barras de error representan la desviación estándar y se realizó un test ANOVA y el test de comparación múltiple de Tukey para evaluar diferencias significativas entre las muestras a distintos dpi. Letras diferentes indican muestras estadísticamente diferentes (n=5; p<0,01).



Una vez encontrado el tiempo postinfiltración óptimo para la determinación de actividad de la enzima β -glucuronidasa, se analizó el efecto de las luces sobre los niveles de acumulación de esta enzima. Para ello, se determinaron los niveles de actividad GUS en extractos de hojas de *Nicotiana benthamiana* crecidas bajo las distintas condiciones de luz tal como se detalló anteriormente. A los cinco días postinfiltración se determinó la actividad específica β -glucuronidasa presente en 1mg de proteína soluble total de cada extracto. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 11, donde puede observarse que el nivel de acumulación de la enzima GUS fue mucho mayor en los extractos de hojas desarrolladas bajo la luz emitida por los tubos fluorescentes. Para el caso de los extractos realizados con hojas desarrolladas bajo las luces LED, tanto *Full Spectrum* como Rojo-Azul, los niveles de acumulación de la enzima GUS fueron 9 veces menores comparados con la condición de luz de los tubos fluorescentes.

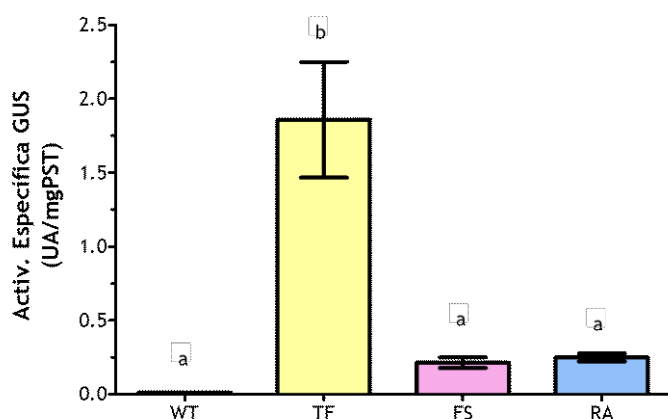


Figura 11: Efecto de la calidad de luz sobre la producción de la enzima β -glucuronidasa (GUS) en plantas *Nicotiana benthamiana*. Se evaluó la actividad enzimática GUS en plantas *Nicotiana benthamiana* crecidas bajo distintas fuentes de luz: tubos fluorescentes (TF), luces LED *Full Spectrum* (FS), y luces LED Rojo-Azul (RA). Las plantas fueron transformadas con la construcción codificante para GUS y procesadas al quinto dpi. Se determinó la cantidad de proteína soluble total (PST) y se midió la actividad enzimática GUS por el método fluorimétrico que utiliza MUG como sustrato. Las barras representan la actividad específica GUS expresadas en unidades arbitrarias (UA) definidas como unidades de fluorescencia generadas en 1 minuto por 1mg de PST. Se realizaron 3 ensayos independientes con un $n=3$. Las barras de error representan el desvío estándar. Se realizó un test de ANOVA y el test de comparación de muestras de Tukey para establecer diferencias significativas entre las muestras. Igual letra designa que las muestras no son estadísticamente diferentes ($n=9$; $p<0,001$).

Estos resultados indican que los tubos fluorescentes son la mejor fuente de iluminación para la síntesis de la enzima β -glucuronidasa en plantas de *Nicotiana benthamiana* en las condiciones de expresión de ensayo utilizadas

Efecto de las condiciones de luz sobre la acumulación de la proteína fluorescente verde en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Para evaluar el efecto de las distintas condiciones de iluminación estudiadas sobre los niveles de acumulación de RE-GFP se infiltraron hojas de plantas *Nicotiana benthamiana* de 4 semanas de edad crecidas bajo las distintas fuentes de luz, con una concentración de $DO_{600}=0,1$ de agrobacterias transformadas con la construcción del cDNA codificante para la proteína fluorescente verde. A los 3 días de realizada la agroinfiltración, las hojas transformadas se expusieron a luz ultravioleta (UV) para observar los niveles de fluorescencia verde. Luego se realizaron extractos de estas hojas según las condiciones de extracción optimizadas como se detalla en el Anexo I para cuantificar los niveles de fluorescencia verde y evaluar los niveles de acumulación de GFP por inmunoensayo.

La figura 12A, muestra las fotos de hojas expuestas a luz UV a partir de las cuales se puede observar una intensidad de fluorescencia levemente mayor para la hoja perteneciente a las plantas crecidas bajo tubos fluorescentes como fuente de luz, aunque las diferencias no son muy notorias. La figura 12B muestra los niveles de fluorescencia verde presentes en cada extracto de hoja, donde se puede ver que dichos niveles son mayores en los extractos correspondientes a plantas crecidas bajo los tubos fluorescentes. Los niveles más bajos se registraron para los extractos de plantas crecidas bajo luces LED *Full Spectrum*. La misma cantidad de proteína soluble total se utilizó para cada muestra. Por último, los niveles de acumulación de GFP fueron evaluados por inmunoensayo utilizando los mismos extractos utilizados para las determinaciones de fluorescencia verde. Se utilizó un anticuerpo específico anti-GFP y la intensidad de banda se normalizó según la intensidad de banda de la subunidad mayor de la RuBisCo observada en un gel teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250. Los resultados revelaron que los mayores niveles de GFP se obtuvieron para la condición de luz de tubos fluorescentes (figura 12C), y que estos niveles disminuyeron para la condición de luz LED *Full Spectrum*, lo cual coincide con las medidas de fluorescencia verde. Sin embargo, en este caso, el menor nivel de acumulación de GFP se registró para las luces LED Rojo-Azul, lo cual no guarda correlación con las medidas de fluorescencia.

Estos resultados indican que los mayores niveles de acumulación de GFP se obtienen con plantas de *Nicotiana benthamiana* crecidas bajo los tubos fluorescentes.

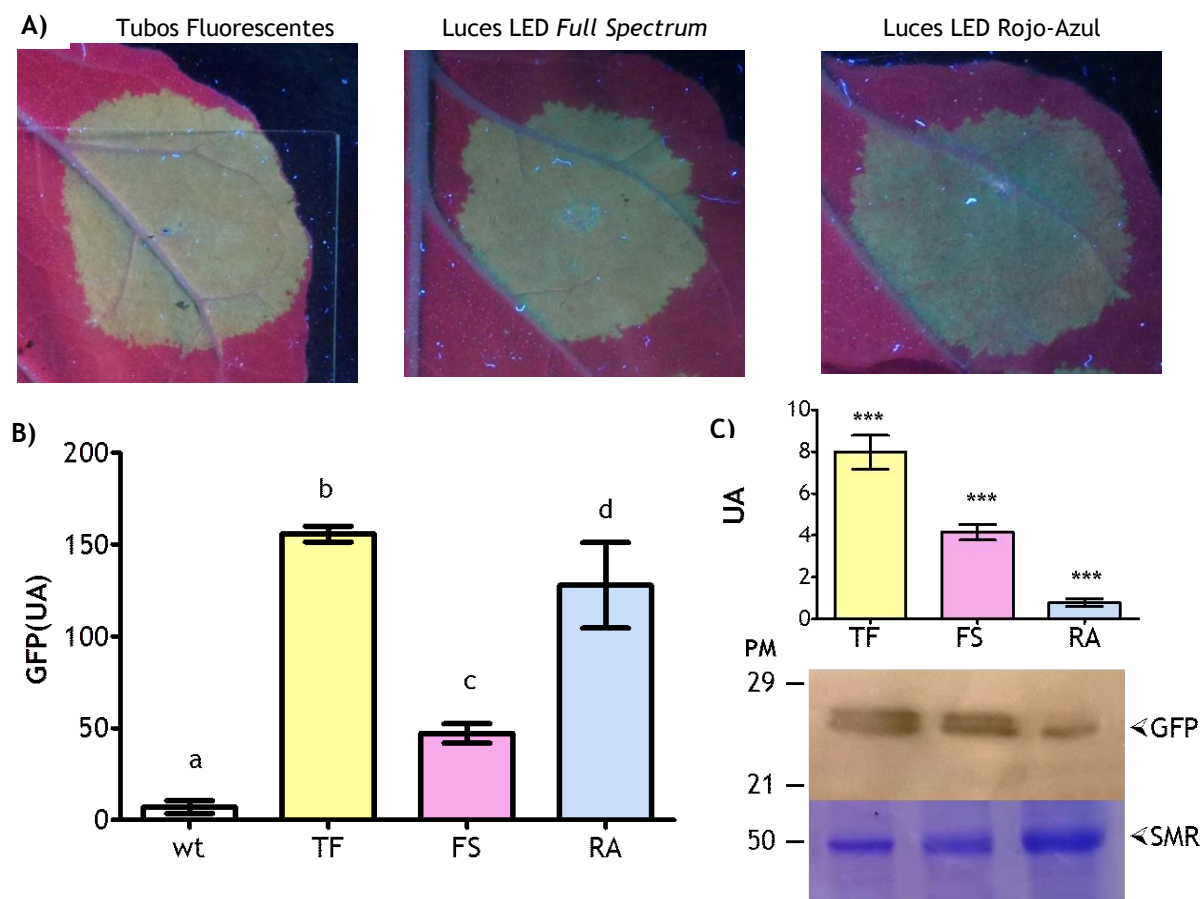


Figura 12: Efecto de la calidad de luz sobre la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) en plantas *Nicotiana benthamiana*. Se evaluó el nivel de acumulación de GFP en plantas *Nicotiana benthamiana* crecidas bajo distintas fuentes de luz: tubos fluorescentes (TF), luces LED *Full Spectrum* (FS), y luces LED Rojo-Azul (RA). Las plantas fueron transformadas y procesadas al tercer día postinfiltración. En primer lugar, las hojas de estas plantas se expusieron a luz UV (A) para observar los niveles de fluorescencia verde. Luego, se realizaron extractos de estas hojas que fueron utilizados para la cuantificación de fluorescencia verde (B) y detección de GFP por inmunoensayo con un anticuerpo anti-GFP (C). Los resultados muestran que hubo mayor acumulación de GFP en las plantas crecidas bajo los tubos fluorescentes. Los niveles de fluorescencia verde se expresan como unidades arbitrarias (UA) definidas como las unidades de fluorescencia presentes en 1mg de proteína soluble total. Se realizaron 3 ensayos independientes, cada uno de ellos por triplicado (n=9). El inmunoensayo se realizó con los mismos extractos utilizados para las medidas de fluorescencia. El patrón de peso molecular (PM) se expresa en kDa y se muestra en el lateral de la figura. La intensidad de bandas se normalizó por la intensidad de banda de la subunidad mayor de la RuBisCo (SMR) obtenida por tinción de un gel con Coomassie Brilliant Blue R-250 utilizando el programa ImageJ. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA y posteriormente un test de Tukey de comparación de muestras para establecer diferencias significativas. Para las medidas de fluorescencia, letras diferentes indican que las muestras son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). Para la intensidad de bandas, $***=p < 0,01$.

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de expresión transitoria de los genes reporteros GUS y GFP concuerdan con el análisis y resultados de los parámetros de crecimiento de las plantas *Nicotiana benthamiana* en los cuales la mejor condición de luz es la de los tubos fluorescentes.

Análisis de los niveles de acumulación de BiP.

La proteína BiP es una chaperona cuya síntesis se activa como parte de la respuesta a proteínas mal plegadas a partir de un desbalance entre la síntesis y degradación de proteínas y en distintas situaciones de estrés. Teniendo en cuenta este rol se evaluó el efecto de las distintas luces sobre la acumulación de BiP en plantas que producen GUS. Para esto, se realizó un inmunoensayo con un anticuerpo específico anti-BiP a partir de los extractos utilizados para evaluar los niveles de la enzima β -glucuronidasa bajo las distintas fuentes de luz. Como control se utilizaron hojas de plantas no infiltradas. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 13 donde se observa que la cantidad de BiP es mayor en todas las hojas agroinfiltradas con la construcción RE-GUS, en relación a las hojas no infiltradas. Por otro lado, los valores de BiP obtenidos para las plantas

crecidas con luz LED ya sea *Full Spectrum* o Rojo-Azul son superiores a los obtenidos para hojas iluminadas con tubos fluorescentes, a pesar de que en estas plantas los niveles GUS eran 9 veces inferiores a los obtenidos con tubos fluorescentes.

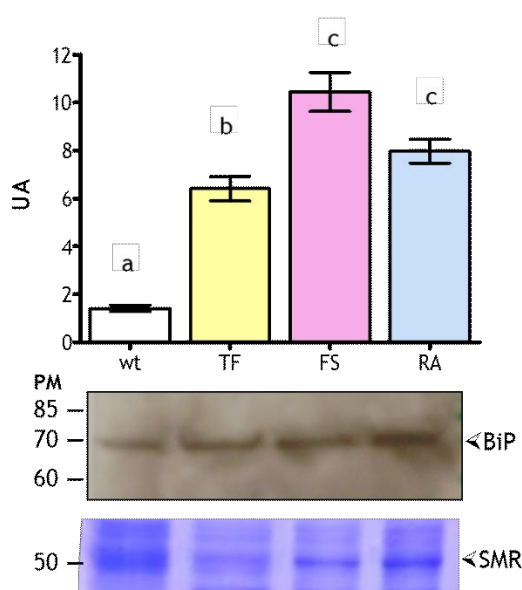


Figura 13: Efecto de la calidad e intensidad de luz sobre los niveles de acumulación de BiP en hojas de *N. benthamiana* que producen GUS. Se evaluaron los niveles de acumulación de la proteína BiP por inmunoensayo en extractos de hojas wild type (wt) y transformadas con agrobacterias llevando en gen de la enzima GUS y crecidas bajo las distintas fuentes de luz estudiadas: tubos fluorescentes (TF), luces LED *Full Spectrum* (FS), y luces LED Rojo-Azul (RA). Estos extractos fueron los mismos que los utilizados en los ensayos de GUS. La intensidad de las bandas obtenidas en el inmunoensayo fue cuantificada utilizando el programa ImageJ y luego normalizada por la intensidad de banda obtenida en el gel teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250 para la subunidad mayor de la RuBisCo (SMR) (panel inferior). El patrón de peso molecular (PM) se expresa en kDa y se muestra en el lateral de la figura. En el panel superior el gráfico de barras muestra los resultados de dicha normalización en unidades arbitrarias (UA). Estos resultados muestran que se obtuvo mayor cantidad de BiP en las plantas crecidas bajo luces LED *Full Spectrum* y Rojo-Azul. Las barras de error representan el desvío estándar y letras diferentes designan muestras estadísticamente diferentes según un test de ANOVA y posterior test de Tukey (n=3; p<0,05).

Estos resultados, junto con las medidas del contenido relativo de agua y los parámetros de crecimiento analizados, refuerzan la idea de que las plantas se encuentran en un estado fisiológico más saludable cuando crecen bajo los tubos fluorescentes.

A partir de los resultados obtenidos en esta primera sección, se concluye que la mejor condición para el crecimiento y para la síntesis de proteínas heterólogas sencillas es la iluminación con tubos fluorescentes a una intensidad mínima de $150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Por lo tanto, esta será la fuente de luz elegida para posteriores ensayos.

Análisis de una estrategia de ingeniería de la vía secretoria para incrementar la síntesis de proteínas heterólogas en plantas.

Análisis de los genes candidatos.

La mayoría de las proteínas recombinantes de interés farmacéutico e industrial, requieren de modificaciones que son propias de la vía secretoria y tanto en células de mamíferos como de levaduras se han desarrollado estrategias para mejorar la producción a través de expresión de reguladores claves como el factor XBP1 que participa en la diferenciación de células B en células plasmáticas. En células vegetales el modelo de células secretorias se encuentra en semillas en desarrollo ya que las mismas sintetizan activamente una gran cantidad de proteínas y otras moléculas de reserva. Teniendo en cuenta que el factor XBP1 es un factor bZIP con un dominio transmembrana que participa en la UPR, se intentó identificar a sus ortólogos en semillas inmaduras de *Arabidopsis thaliana*, seleccionándose a los factores AtbZIP60 (At1g42990), AtbZIP17 (At2g40950) y AtbZIP28 (At3g10800) como potenciales candidatos. Estos factores de transcripción poseen además de sus dominios bZIP de interacción con el ADN, un dominio transmembrana que los ancla al retículo endoplásmico y una señal de localización nuclear que permite su ingreso al núcleo luego de ser activados. Estas características estructurales son comunes con el factor XBP1 de mamíferos y se resumen en la tabla 8.

Tabla 8: Características estructurales de los factores de transcripción bZIP60, bZIP17 y bZIP28 de *Arabidopsis thaliana*, comunes al factor XBP1.

Factor de transcripción	XBP1	AtbZIP60	AtbZIP17	AtbZIP28
Gen codificante	7494	AT1G42990	AT2G40950	AT3G10800
GenBank Accession No.	NM_013842	NM_103458	NM_129659	NM_111917
Longitud de la forma completa	267 aa	295 aa	721 aa	675 aa
Localización subcelular	RE y núcleo	RE y núcleo	RE, Golgi y núcleo	RE, Golgi y núcleo
Señal de localización nuclear	69-85	141-161	1: 193 2: 248	1: 154 2: 304
Dominio bZIP	63-126	141-183	226-287	187-252
Dominio transmembrana	181-198	218-249	365-389	322-344
Sitios de clivaje proteolítico	1: 185	1: 204 2: 262	1: 364 2: 630	1: 237 2: 605
Denominación de la forma activa	XBP1(s)	bZIP60 Δ C	bZIP17 Δ C	bZIP28 Δ C
Longitud de la forma activa	185 aa	216 aa	363 aa	321 aa
Ortólogo en mamíferos	---	XBP1	ATF6	ATF6

Los niveles de expresión de los genes que codifican para el bZIP60, el bZIP17 y el bZIP28 fueron evaluados *in silico*, durante las distintas etapas del desarrollo de semillas de *Arabidopsis thaliana* utilizando la herramienta online Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Este análisis, incluyó también a genes que codifican para proteínas involucradas en el procesamiento de los bZIPs mencionados, como Ire1 y las proteasas S1P y S2P del Golgi [142]; al gen *pei1*, cuya expresión es necesaria para la embriogénesis en *Arabidopsis thaliana* y está vinculado, al igual que los bZIPs en distintos tipos de estrés [143]-[145]. Además se incluyeron genes UPR que se ha descrito que son activados durante esta respuesta celular, como los genes que codifican para BiP, Calnexina1, Calreticulina1B [108], [146]; a genes involucrados en el llenado de las semillas como *cru3* y *per1* y genes normalizadores de los niveles de expresión como *ef-1a* y *ap2m* [147], [148].

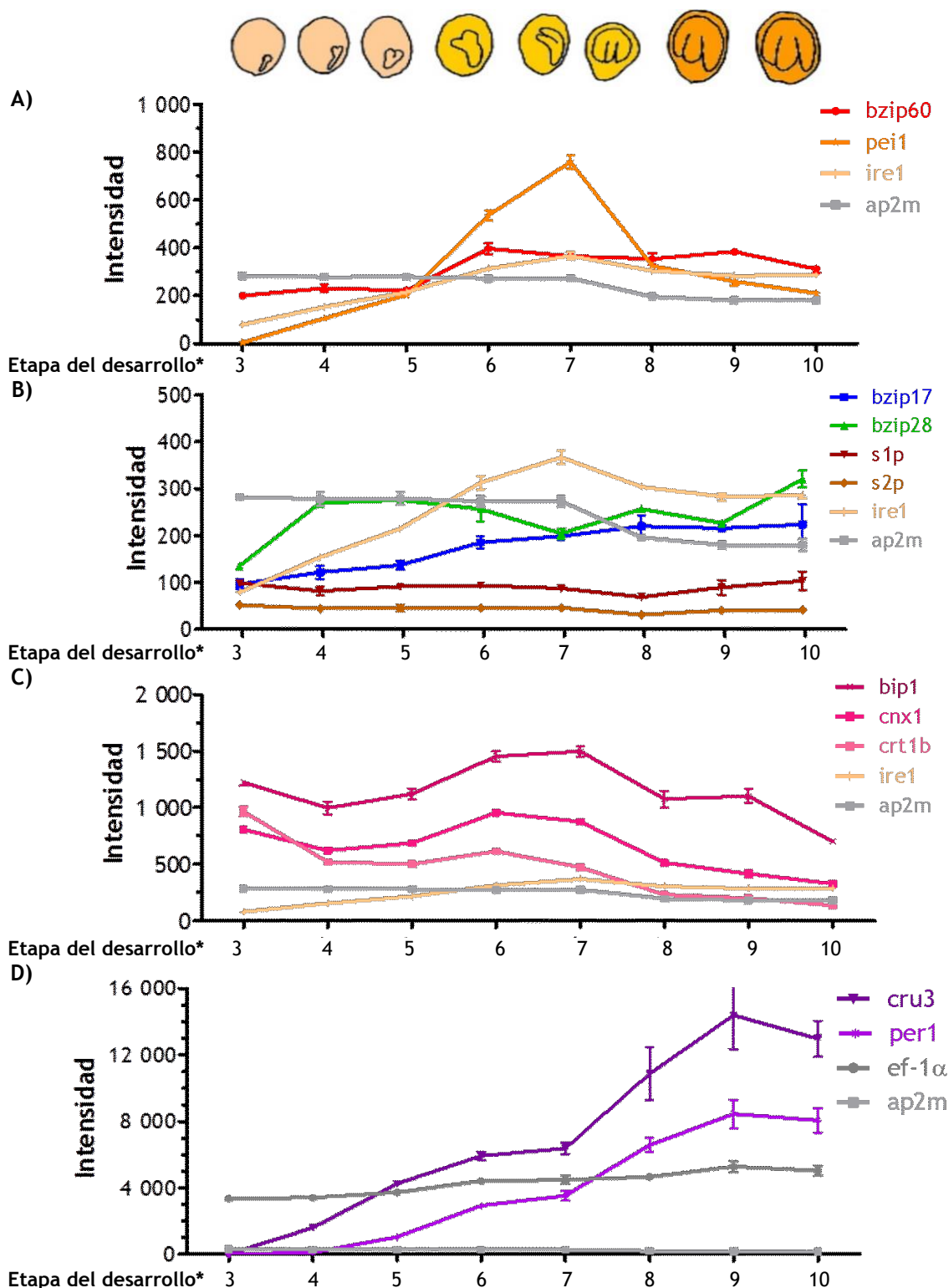


Figura 14: Análisis de expresión in silico de genes vinculados a UPR en las distintas etapas de desarrollo de semillas de *A. thaliana*. En el panel A se muestran los niveles de mRNA del factor bZIP60 y otros genes vinculados directamente con este factor como *pei1* e *ire1*. En el panel B se muestra el análisis de expresión de los genes que codifican para los factores bZIP17 y bZIP28 y genes vinculados con su procesamiento como los genes *s1p* y *s2p*. En el panel C se muestran los niveles de mRNA de genes involucrados en la respuesta UPR y que son inducidos por los bZIPs: el gen que codifica para la proteína de unión 1 (BiP1), calnexina 1 (CNX1), calreticulina 1B (CRT1B). En el panel D, se muestran genes involucrados en el llenado de semillas como el gen que codifica para la proteína de reserva de semilla 12S (*cru3*) y el gen que codifica para una proteína de la familia de las peroxiredoxina cisteína-1 (*per1*). En todos los casos se muestran también los niveles de mRNA de genes que se utilizan como referencia para este tipo de análisis como son: una proteína del complejo adaptador de clatrina (APM2) y el factor de elongación EF-1α. El eje x indica las distintas etapas del desarrollo de semillas de *A. thaliana* evaluadas. *Etapas del desarrollo 3, 4 y 5 corresponden a silicuas con semilla y las etapas 6 a 10 corresponden a etapas de semillas.

Los resultados del análisis de expresión *in silico* se muestran en la figura 14, a partir de los cuales se puede ver que la expresión del gen del factor bZIP60 (figura 14A) se duplica a partir de la etapa 5 del desarrollo de semillas, cuando se inicia la etapa de diferenciación celular y tejidos [149]. Este incremento va acompañado de un aumento del gen de *Ire1*, lo cual era esperable debido a su participación en el procesamiento de este factor bZIP a su forma activa [108]. Este resultado indicaría que el bZIP60 podría tener una función similar al XBP1 en el desarrollo de la vía secretoria. También se observa a partir de la etapa 5, un aumento en la expresión de *pei1*, necesario para el desarrollo del embrión en el estadio corazón. El incremento observado para los genes *bZIP60*, *pei1* e *ire1*, coincide con el período donde se sintetizan las proteínas de reserva (*cru3*), superando los valores del gen *ap2m* utilizado frecuentemente para normalizar. Por otro lado, los niveles de expresión de los genes que codifican para los factores bZIP17 y bZIP28 (figura 14B) permanecen relativamente constantes en el período de desarrollo de la semilla. En concordancia con estos valores, la expresión de los genes que codifican para las proteasas involucradas en el clivaje de estos factores, S1P y S2P [108] también es baja y no se modifica a lo largo de periodo de desarrollo de la semilla. Otros genes que participan en la UPR como por ejemplo BiP1, Calnexina1 y Calreticulina1B también sufren un incremento en su expresión a partir del estadio de desarrollo 5 (figura 14C) en coincidencia con los cambios en los niveles del bZIP60, y alcanzan su máximo nivel en la etapa 7, donde comienza la etapa de llenado y acumulación de proteínas de reserva. Cabe destacar que el aumento mencionado no fue uniforme para los tres genes UPR analizados, sino que este fue mayor para BiP, registrándose valores un 30% menores para Calnexina1 y un 60% menores para el caso de la Calreticulina1B. Este aumento en las chaperonas y co-chaperonas del retículo endoplásmico, podría deberse a una mayor demanda en la síntesis de proteínas y consecuente activación de la respuesta UPR para afrontar dicha situación. Por último, el análisis de expresión de los genes involucrados en el llenado de semillas, (figura 14D) mostró un incremento en sus niveles en etapas del desarrollo que son posteriores al máximo de expresión registrado para el gen *bzip60* y los genes UPR.

Los resultados del análisis de expresión *in silico*, apoyan la hipótesis de que el factor de transcripción bZIP60 podría contribuir al desarrollo de la semilla interviniendo en la fase de preparación previa a la acumulación de proteínas de reserva. A partir de este análisis, se han seleccionado también los genes candidatos *pei1* y los codificantes para Calnexina1 y Calreticulina1B ya que alcanzan altos niveles de expresión en fases del desarrollo de semillas que coinciden con la acumulación de nutrientes de reserva. Se ha descrito que *pei1* es un regulador clave necesario para la embriogénesis de *A. thaliana* [143], por lo que es de interés evaluar su efecto sobre la acumulación de proteínas heterólogas. En cuanto a Calnexina1 y Calreticulina1B, son proteínas residentes del RE que asisten al plegado proteico y su sobre-expresión es una estrategia que ya se ha utilizado en otros sistemas de expresión.

Diseño experimental.

Para evaluar el efecto de los distintos genes candidatos *in vivo* sobre los niveles de acumulación de proteínas reporteras a partir de su efecto sobre la vía secretoria, se realizaron ensayos de expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* en presencia y ausencia de estos efectores. Para esto, se asumió que tanto las construcciones génicas de los efectores, como la de los reporteros son transferidos y se expresan en la misma célula, tal como se ha demostrado en algunos trabajos de glicoingeniería [150], donde a partir de la agroinfiltración de varias construcciones es posible lograr un patrón de glicosilación uniforme.

Los cDNA codificantes para los efectores (o sus delecciones -formas activas- según el caso) fueron subclonados en distintos vectores binarios: pEarley104, pGWB41 o pEAQ-HT-DEST1 (tabla 9). Estos plásmidos poseen el promotor CaMV35S y terminadores de la transcripción de genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de opinas. El vector pEAQ-HT-DEST1 posee además, la secuencia codificante para el supresor de silenciamiento p19 que podría influir en los resultados obtenidos en este trabajo. Por esta razón, para los ensayos de acumulación de las proteínas reporteras, se incluyó un control que consistió en la co-infiltración del gen reportero y el gen codificante para p19 en *trans*. Los efectores candidatos cuyo clonado a vectores binarios resultó

exitoso, como son los factores bZIP60, bZIP17, bZIP28 y Calnexina1, se detallan en la tabla 9 y fueron utilizados para los ensayos posteriores. Los demás efectores se detallan en el Anexo III. Para todos los ensayos realizados, se asumió que los factores de transcripción bZIP candidatos, a pesar de ser codificados por genes de *A. thaliana* serían capaces de unirse a los promotores de los genes UPR de *N. benthamiana*.

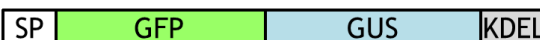
Los genes reporteros utilizados están dirigidos a la vía secretoria (figura 15). A partir de la segunda hipótesis planteada en este trabajo, en la cual se propone que la síntesis de las proteínas reporteras estaría limitada por la capacidad de plegado y transporte de la célula, se analizaron los niveles de acumulación de proteínas reporteras con diferentes requerimientos de plegado que fueron clasificadas en dos grupos. Por un lado las proteínas sencillas: la enzima β -glucuronidasa (RE-GUS) y la proteína fluorescente verde (RE-GFP) [141] y por otro, las proteínas complejas que necesitan de la acción de foldasas y proteínas disulfuro isomerasas, entre otras, para su correcto plegado: el anticuerpo simple cadena 2G3 (RE-RFP-2G3) [151] y el anticuerpo monoclonal tetramérico completo 14D9 (RE-HC14D9 y LC14D9) [82]. La figura 15 muestra un esquema representativo de las construcciones génicas codificantes para estas proteínas reporteras. Todas estas construcciones poseen la secuencia de un péptido señal (SP) secretorio, de ratón para el caso de GUS, el anticuerpo 2G3 y el 14D9, y de plantas para el caso de GFP. Estas construcciones, a excepción de la cadena liviana del anticuerpo 14D9, poseen también la señal de retención en el retículo endoplásmico KDEL [82]. Además, la construcción para el anticuerpo simple cadena 2G3 muestra la fusión de este anticuerpo con la proteína fluorescente roja (RFP) en el N-terminal y un tag de seis residuos de histidinas en el C-terminal que facilitarían su detección [151].


Tabla 9: Características de las construcciones génicas de los efectores utilizados

Efeotor	<i>AtbZIP60ΔC</i>	<i>AtbZIP17</i>	<i>AtbZIP28ΔC</i>	Calnexina1 (<i>AtCNX1</i>)
Accession N.	AT1G42990	AT2G40950	AT3G10800	AT5G61790
Naturaleza	Factor de transcripción del tipo bZIP.	Factor de transcripción del tipo bZIP.	Factor de transcripción del tipo bZIP.	Lectina monovalente residente del RE.
Forma	Activa	Completa, inactiva	Activa	Completa
Vector Binario*	pEarley102[152]	pGWB41 [153]	pEAQ-HT-DEST1 [154]	
Promotor	35S CaMV enhanced	35S CaMV	35SCaMV	
Terminador	ocs	nos	Nos	
Otros elementos	Enhancer traduccional TMV Omega, secuencia líder 5'	---	RNA-2 CPMV 5' UTR modificada. RNA-2 CPMV 3' UTR Supresor de silenciamiento p19	

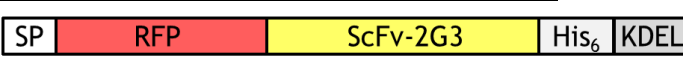
CaMV= Virus del mosaico de coliflor, ocs=octopina sintasa, nos=nopalina sintasa, TMV=virus del mosaico de tabaco, CPMV=virus del mosaico de poroto. *ver Anexo III para la estrategia de clonado utilizada.


Proteínas reporteras de síntesis y plegado sencillo:

Enzima β -glucuronidasa: RE-GUS 

Proteína fluorescente verde: RE-GFP 

Proteínas reporteras que requieren de la acción de foldasas y otras chaperonas para su plegado:

Anticuerpo simple cadena 2G3: RE-RFP-2G3 

Anticuerpo monoclonal tetramérico 14D9: RE-HC14D9 


LC14D9 

Figura 15: Representación esquemática de los cDNA que codifican para las proteínas reporteras utilizadas. Se representan las construcciones génicas utilizadas para la enzima β -glucuronidasa (RE-GUS), la proteína fluorescente verde (RE-GFP), el anticuerpo simple cadena 2G3 (ScFv-2G3) fusionado a la proteína fluorescente roja (RFP) y a un tag de histidinas (His_6) para su detección y las construcciones que codifican para la cadena liviana (LC14D9) y la cadena pesada del anticuerpo monoclonal completo 14D9, de conformación tetramérica ($\gamma 2\kappa 2$). Todas las construcciones poseen la secuencia para un péptido señal (SP) y la señal de retención en el retículo endoplásmico, KDEL (excepto LC14D9). El esquema no se encuentra a escala ya que no guardan relación con el tamaño real de los distintos genes o señales.

Los vectores binarios con los cDNAs correspondientes a los efectores y proteínas reporteras, fueron introducidos en células de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 que fueron utilizadas como herramienta para la transferencia de genes. La cantidad de agrobacterias utilizada en los distintos ensayos fue ajustada específicamente para cada construcción. Las plantas de *Nicotiana benthamiana* utilizadas fueron crecidas en cuarto de cultivo a 22°C de temperatura y 70% de humedad, bajo tubos fluorescentes con un fotoperíodo de luz:oscuridad de 16:8hrs durante 4 semanas.

Efecto de la sobre-expresión de los genes candidatos sobre los niveles de acumulación de proteínas sencillas en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Efecto de la sobre-expresión del gen codificante para el factor bZIP60ΔC sobre la acumulación de proteínas reporteras dirigidas a la vía secretoria.

El efecto de la versión truncada del factor bZIP60 (bZIP60ΔC), ortólogo de plantas de XBP1, sobre la acumulación de la enzima β-glucuronidasa (RE-GUS) y la proteína fluorescente verde (RE-GFP) se evaluó por expresión temporal por agroinfiltración. Como control, se utilizó una suspensión de agrobacterias que contenían únicamente el cDNA codificante para las proteínas reporteras utilizadas (Mock). Un segundo control incluyó además al supresor del silenciamiento génico p19, para poder comparar el impacto de los distintos efectores, ya que algunas construcciones están en el vector pEAQ-HT-DEST1 que lo posee. La concentración de agrobacterias se ajustó de manera de obtener una $DO_{600}=0,4$ para RE-GUS, $DO_{600}=0,1$ para RE-GFP; $DO_{600}=0,1$ para p19 y una $DO_{600}=0,2$ para el bZIP60ΔC. Las muestras se cosecharon a los 5 o 3 días postinfiltración para evaluar los niveles de acumulación de GUS o GFP respectivamente. Los niveles de GUS se evaluaron por determinación de actividad enzimática y los niveles de GFP por cuantificación de fluorescencia verde e inmunoensayo (ver Materiales y Métodos).

A partir de estos ensayos, se observó que el factor de transcripción bZIP60ΔC incrementa la actividad GUS en un 50% con respecto al control y que la presencia del supresor de silenciamiento p19 no modifica los niveles de esta proteína reportera. Cuando los ensayos se realizaron en presencia de bZIP60ΔC y p19 no se encontraron diferencias significativas en la actividad GUS con respecto al control (figura 16, panel A). En los ensayos en los que se utilizó GFP como reportera, también se obtuvo un aumento en sus niveles en presencia del bZIP60ΔC aunque el efecto observado fue menor que el obtenido para GUS (figura 16, paneles B y C). La presencia de p19 no modificó los niveles de GFP.

Dado que el factor bZIP60ΔC se encuentra involucrado en la señal UPR, se procedió también a evaluar los niveles de BiP por inmunoensayo utilizando un anticuerpo específico de BiP. Para esto se emplearon los mismos extractos del ensayo que utilizaba GFP como reportera, obteniéndose los resultados presentados en la figura 17. Se observa que los niveles de BiP son mayores en las plantas que expresan GFP en relación a las no transformadas y que este incremento se duplica cuando se co-transforma con los genes codificantes para GFP y el factor bZIP60ΔC. Este resultado confirma el hecho de que la producción de proteínas heterólogas puede provocar estrés en el retículo endoplásmico y además muestra que la expresión de BiP es inducida en presencia del bZIP60ΔC por lo que la señal UPR ha sido activada por este factor de transcripción.

Estos resultados en conjunto, demuestran que el factor bZIP60ΔC incrementa los niveles de acumulación de proteínas reporteras de la vía secretoria y que activa la señal UPR.

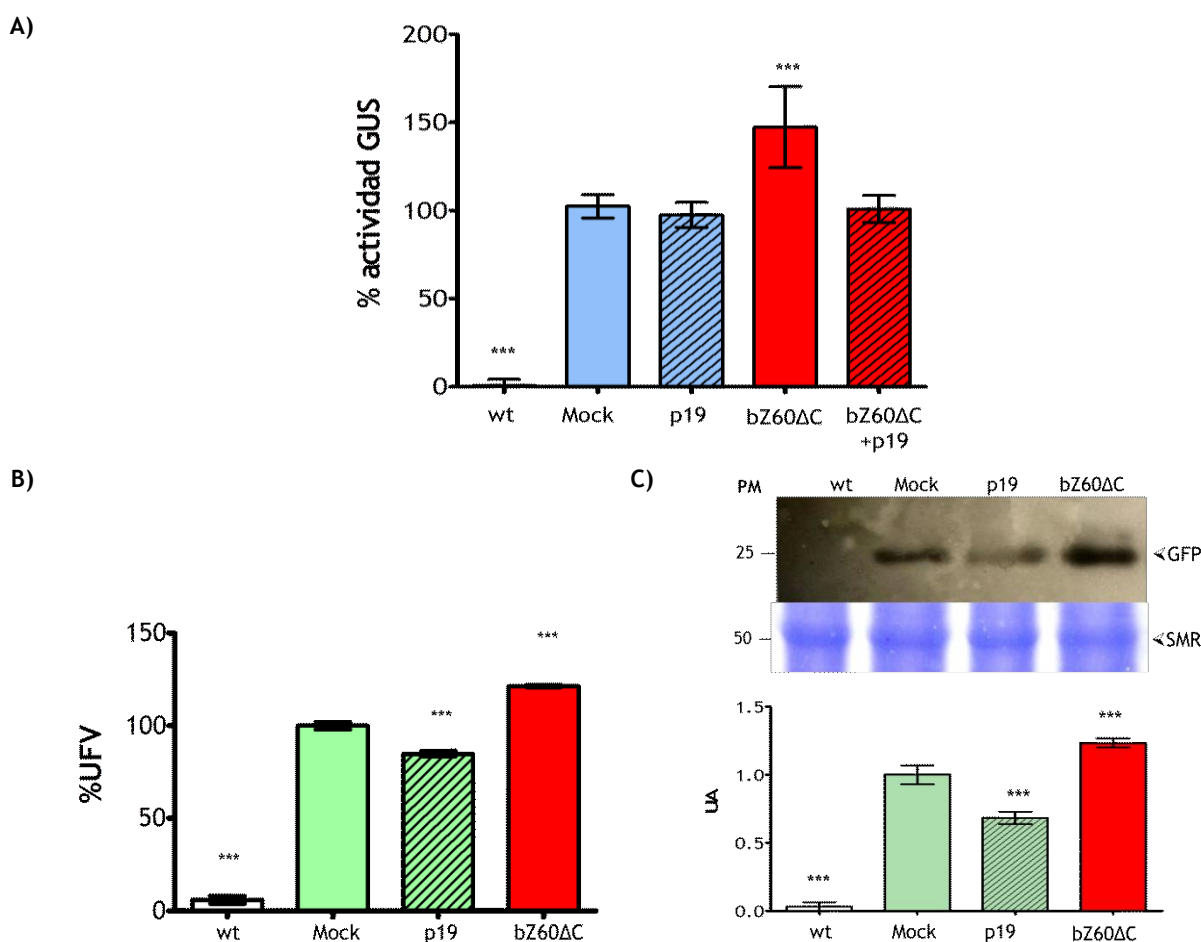


Figura 16: Efecto del factor bZIP60ΔC sobre los niveles de acumulación de proteínas reporteras sencillas. Se evaluaron los niveles de acumulación de la enzima β-glucuronidasa (RE-GUS) por determinación de actividad enzimática (panel A) y de la proteína fluorescente verde (RE-GFP) por cuantificación de fluorescencia verde (UFV) e inmunoensayo (paneles B y C respectivamente); en presencia y ausencia del bZIP60ΔC. Este efecto se comparó también con el producido por el supresor de silenciamiento p19. Para ambas proteínas reporteras, se observó un aumento en los niveles de acumulación en presencia del factor bZIP60ΔC. La presencia de p19 no mejoró los niveles de ninguna de las proteínas reporteras ensayadas. Para el caso de GUS, se ensayó también la acción conjunta del bZIP60ΔC con p19, lo cual no mostró una mejora en los niveles de GUS con respecto al control (Mock), siendo dichos niveles menores que los obtenidos para la muestra transformada con bZIP60ΔC únicamente. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad GUS o de unidades de fluorescencia verde (UFV) con respecto al control. Para todas las medidas, se utilizó la misma cantidad de proteína total para cada muestra, 1mg para GUS y 100μg para GFP. Los niveles de actividad GUS se evaluaron por el método fluororimétrico que utiliza MUG como sustrato. Para el caso del inmunoensayo para GFP la intensidad de banda se cuantificó por densitometría utilizando el programa ImageJ y se utilizó a la subunidad mayor de la RuBisCo (SMR) como control de carga, tal como se muestra en la tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250. El patrón de peso molecular (PM) se expresa en kDa y se muestra en el lateral de la figura. Se realizaron dos y tres ensayos independientes para GFP y GUS respectivamente, utilizando para cada uno, hojas de tres plantas diferentes. Para todos los casos, se realizó un test de ANOVA y el test de Dunnet para analizar diferencias significativas entre las distintas muestras y el control (Mock) (**=p<0,01). Las barras de error representan la desviación estándar. wt=wild type, hace referencia a la muestra sin transformar.

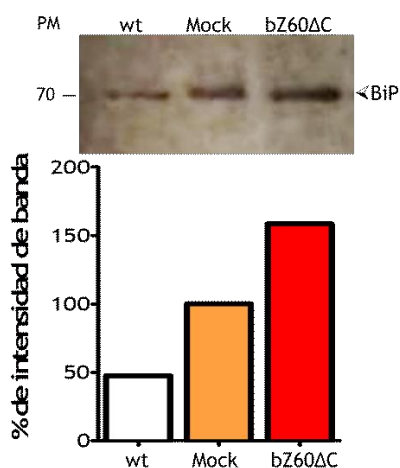


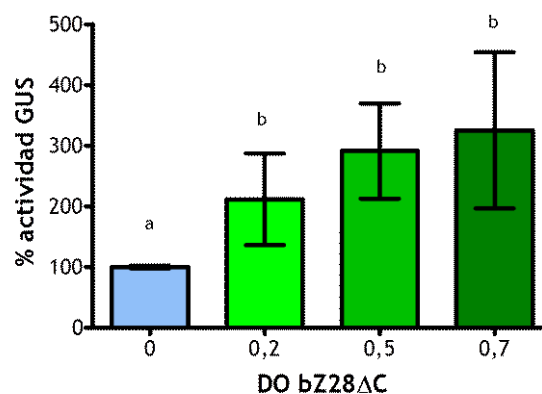
Figura 17: Efecto de la presencia del factor bZIP60ΔC sobre los niveles de BiP. Inmunoensayo para la chaperona BiP en presencia o ausencia del bZIP60ΔC. Se utilizaron los mismos extractos que para la cuantificación de la proteína reportera GFP. La expresión de una proteína heteróloga como GFP, aumenta los niveles de BiP con respecto al extracto sin transformar (*wild type*, wt) en un 50%. A su vez, la presencia del factor bZIP60ΔC aumenta los niveles de BiP en un 50% con respecto al extracto control transformado únicamente con GFP (Mock). Para el inmunoensayo se utilizó un anticuerpo específico para BiP y luego la intensidad de las bandas fue cuantificada utilizando el programa ImageJ. El patrón de peso molecular (PM) se expresa en kDa y se muestra en el lateral de la figura.

Efecto de la sobre-expresión de los genes codificantes para los factores *AtbZIP17* y *AtbZIP28ΔC* sobre GUS y GFP.

Los factores de transcripción bZIP17 y bZIP28, al igual que bZIP60, son transductores de la señal UPR, aunque difieren de él en su procesamiento y en la respuesta que generan en las células vegetales, tal como se ha desarrollado en la introducción. Teniendo en cuenta esto y sabiendo de la participación de estos dos factores en la respuesta UPR, se evaluó el efecto del bZIP17 y bZIP28ΔC sobre la acumulación de las proteínas reporteras β-glucuronidasa y la proteína fluorescente verde, tal como se hizo para el factor bZIP60ΔC. Se evaluaron los rendimientos de producción de estas proteínas reporteras en hojas de *Nicotiana benthamiana* en presencia o ausencia de estos factores de transcripción.

Para llevar a cabo este estudio, fue necesario en primer lugar encontrar la mejor condición para la concentración de bacterias a utilizar para la agroinfiltración de hojas con la construcción correspondiente al bZIP28ΔC. Con este objetivo, se transformaron hojas de *Nicotiana benthamiana* con suspensiones de agrobacterias que contenían el gen GUS y distintas concentraciones de agrobacterias transformadas con la construcción que codifica para el factor bZIP28ΔC. Al cabo de 5 días postinfiltración, las hojas se cosecharon, se determinó la actividad enzimática GUS presente en los extractos utilizando la misma cantidad de proteína soluble total para cada muestra. Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas entre las distintas concentraciones de agrobacterias. Sin embargo, a pesar del error en las determinaciones, la actividad enzimática media para una $DO_{600}=0,5$ fue un 50% mayor que para una $DO_{600}=0,2$ y las hojas agroinfiltradas presentaron mejor aspecto que aquellas en las que se usó una $DO_{600}=0,7$. Por lo tanto la concentración de agrobacterias utilizada para la construcción del factor bZIP28ΔC fue de $DO_{600}=0,5$ (figura 18).

Figura 18: Optimización de las condiciones de agroinfiltración para la transformación transitoria de plantas *N. benthamiana* con la construcción que codifica para el factor bZIP28ΔC. Se transformaron transitoriamente hojas de *Nicotiana benthamiana* con el gen que codifica para la enzima β-glucuronidasa (GUS) y con distintas concentraciones de agrobacterias que contenían el gen que codifica para el factor bZIP28ΔC. Pasados los 5 días postinfiltración, se cosecharon las muestras y se determinó la actividad enzimática GUS presente en los extractos. La condición elegida para ensayos posteriores es la de $DO_{600}=0,5$. Se realizó un test de ANOVA y el test de Dunnet para analizar diferencias significativas entre las distintas muestras. Letras distintas denotan diferencias significativas entre las muestras (n=9 plantas; **= $p<0,5$).



Posteriormente se evaluó el impacto de los factores bZIP17 y bZIP28ΔC sobre los niveles de acumulación de GUS y GFP en presencia o ausencia de estos factores, al igual que para el bZIP60ΔC. Dado que el bZIP28ΔC se encuentra en el plásmido pEAQ-HT-DEST1 que contiene a la región codificante para el supresor de silenciamiento p19, se incluyó una segunda muestra control que además de estar transformada con las construcciones correspondientes a las proteínas reporteras, tuviera también el gen p19. Las concentraciones de bacterias para las proteínas reporteras y p19 fueron ajustadas de igual manera que para el bZIP60ΔC. Para la construcción correspondiente al bZIP17 se utilizó una $DO_{600}=0,2$. A los 5 y 3 días postinfiltración se cosecharon las muestras y se midió la actividad GUS y la cantidad de GFP.

Los resultados de estos ensayos (figura 19) mostraron que en presencia del bZIP28ΔC los niveles de actividad GUS aumentaron un 300% con respecto al control (panel A), mientras que los niveles de GFP aumentaron en un 50% (paneles B y C). Estos resultados son similares a los obtenidos con el factor bZIP60ΔC. A diferencia de estos resultados, los niveles de acumulación de estas proteínas no mostraron mejoras en presencia del factor bZIP17, para lo cual es de destacar que para que el bZIP17 pueda dirigirse al núcleo requiere del procesamiento que ocurre cuando la UPR está activa. En cambio, para el bZIP28, se utilizó directamente la forma activa. La presencia del supresor de silenciamiento p19 tampoco modificó los niveles de las proteínas reporteras ensayadas

lo que permite asegurar que el efecto observado para la construcción del bZIP28 Δ C en el pEAQ-HT-DEST1 no se debe a la presencia de p19 en este vector.

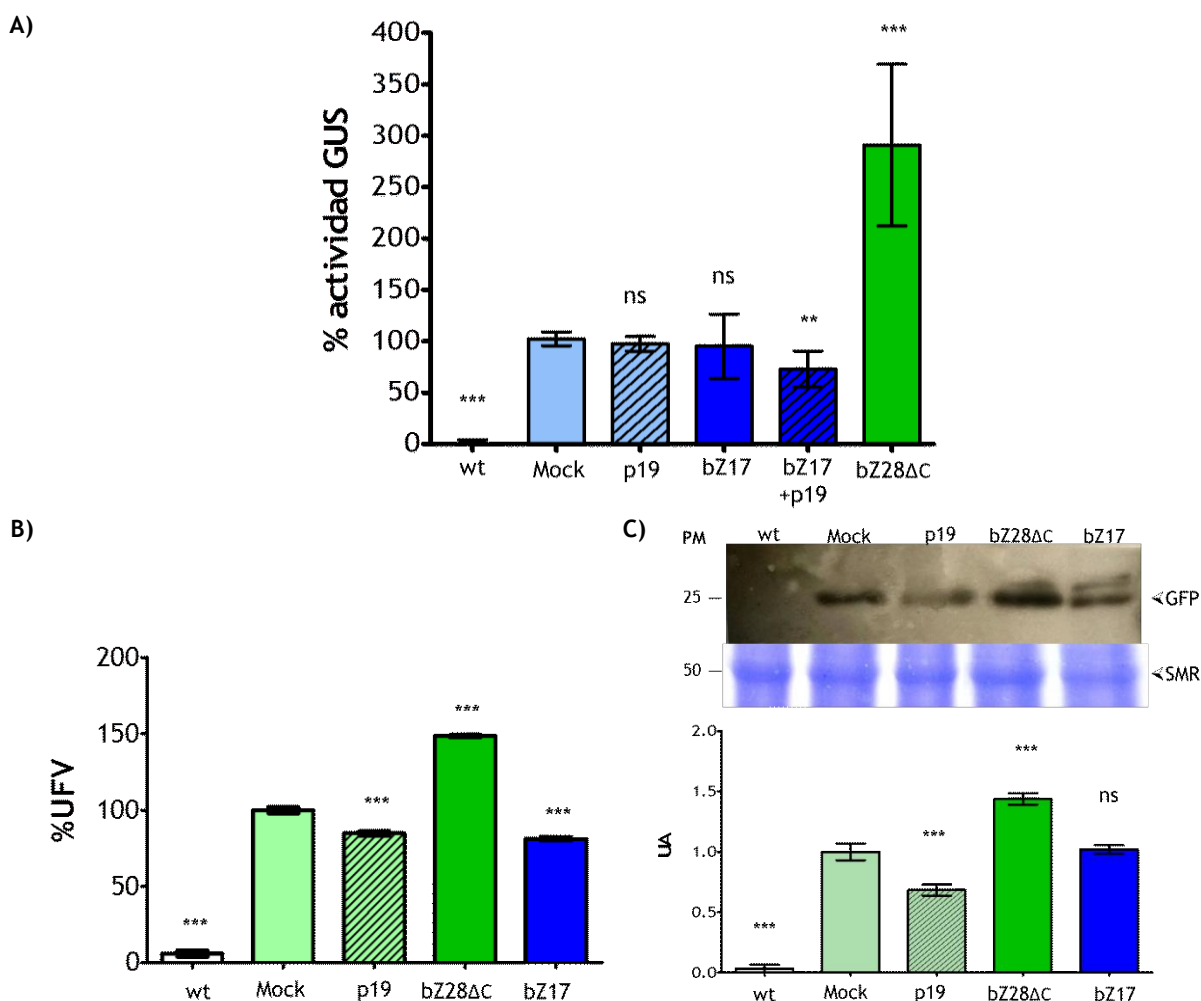


Figura 19: Efecto de los factores bZIP17 y bZIP280 Δ C sobre los niveles de acumulación de proteínas reporteras sencillas. Se evaluaron los niveles de acumulación de la enzima β -glucuronidasa (RE-GUS) por determinación de actividad enzimática (panel A) y de la proteína fluorescente verde (RE-GFP) por cuantificación de fluorescencia verde e inmunoensayo (paneles B y C); en presencia y ausencia de los factores bZIP17 y bZIP28 Δ C. La presencia del factor bZIP28 Δ C produjo un aumento del 300% en los niveles de acumulación de GUS y del 50% para GFP. La presencia del bZIP17 no mejoró los niveles de ninguna de las dos proteínas reporteras ensayadas. Se analizó también el efecto producido por el supresor de silenciamiento p19 que tampoco mejoró ni de GUS ni de GFP. La acción conjunta del bZIP17 con p19 mostró una disminución en los niveles de GUS con respecto al control (Mock), siendo dichos niveles menores que los obtenidos para la muestra con bZIP17 únicamente. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad GUS o de unidades de fluorescencia verde (UFV) con respecto al control. Para todas las medidas, se utilizó la misma cantidad de proteína total para cada muestra, 1mg para GUS y 100 μ g para GFP. Para el caso del inmunoensayo para GFP, se utilizó a la subunidad mayor de la RuBisCo (SMR) como control de carga, tal como se muestra en la tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250. El patrón de peso molecular (PM) se expresa en kDa y se muestra en el lateral de la figura. La intensidad de banda se cuantificó por densitometría. Se realizaron tres ensayos independientes para cada proteína reportera, utilizando para cada uno hojas de tres plantas diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizó un test de ANOVA posterior test de Dunnet para analizar diferencias significativas entre las muestras y el control (**=p<0,5; ***=p<0,01).

Finalmente se evaluaron los niveles de BiP en extractos que expresaban GFP, en presencia y ausencia del bZIP17. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 20, donde se observa que los niveles de BiP aumentan en presencia del factor bZIP17, lo que indica que la señal UPR está activa, lo que sugiere que a pesar de que se utilizó la versión completa de este factor, las condiciones fisiológicas de la planta permitirían su activación.

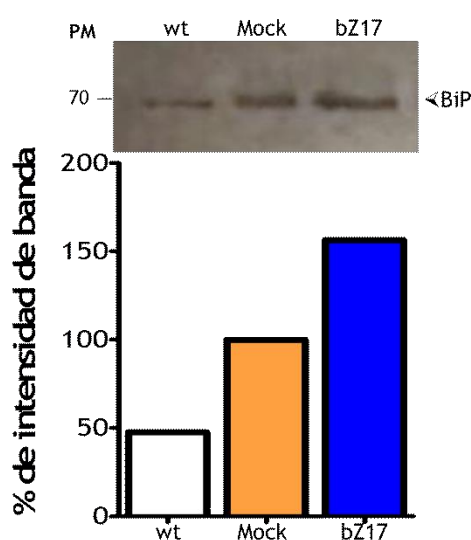


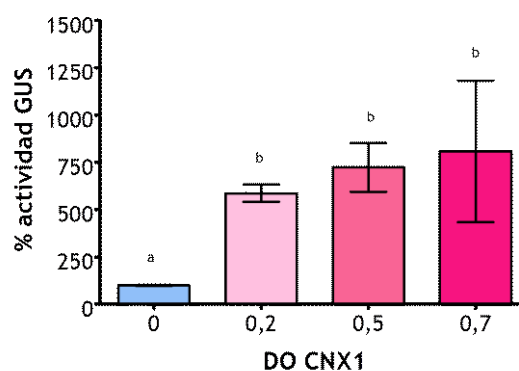
Figura 20: Efecto de la presencia del factor bZIP17 sobre los niveles de BiP. Inmunoensayo para la chaperona BiP en presencia o ausencia del bZIP17. La expresión de una proteína heteróloga como GFP (Mock), aumenta los niveles de BiP con respecto a la muestra sin transformar (*wild type*, wt) en un 50%. A su vez, la presencia del factor bZIP17 aumenta los niveles de BiP en un 50% con respecto al control en ausencia de este factor (Mock). Para este inmunoensayo se utilizaron los mismos extractos que para la cuantificación de la proteína reportera GFP. Se utilizó un anticuerpo específico para BiP y luego la intensidad de las bandas fue cuantificada utilizando el programa ImageJ. El patrón de peso molecular (PM) se expresa en kDa y se muestra en el lateral de la figura.

Estos resultados, en su conjunto, indican que es posible mejorar el rendimiento de producción de proteínas reporteras de síntesis y plegado sencillo a partir de su co-expresión con la forma activa del factor bZIP28, bZIP28 Δ C y que el bZIP17 activa la respuesta UPR aunque esta activación no modifica significativamente los niveles de GUS y GFP.

Efecto de la sobre-expresión de genes codificantes para chaperonas sobre los niveles de GUS y GFP.

Otra estrategia de mejoramiento de la producción de proteínas secretorias consiste en la co-expresión del gen de interés con genes codificantes para de chaperonas y/o foldasas. En esta sección, se evaluó el efecto de Calnexina1 (CNX1) sobre los niveles de acumulación de la enzima β -glucuronidasa y la proteína fluorescente verde. Inicialmente se ajustó la cantidad de agrobacterias utilizada para la agroinfiltración utilizando la enzima GUS como reportera. A partir de los resultados obtenidos (figura 21), se seleccionó una $DO_{600}=0,5$ ya que la actividad GUS fue un 25% superior a la obtenida con una cantidad de agrobacterias correspondiente a $DO_{600}=0,2$ y el error en la determinación de GUS es menor que para la condición de $DO_{600}=0,7$.

Figura 21: Optimización de las condiciones de agroinfiltración para la transformación transitoria de plantas *N. benthamiana* con la construcción que codifica para Calnexina1. Se transformaron transitoriamente hojas de *Nicotiana benthamiana* con el gen que codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS) y con distintas concentraciones de agrobacterias que contenían el gen que codifica para la chaperona Clnexina1. Pasados los 5 días postinfiltración, se cosecharon las muestras y se determinó la actividad enzimática GUS presente en los extractos. La condición elegida para ensayos posteriores es la de $DO_{600}=0,5$. Se realizó un test de ANOVA y el test de Dunnet para analizar diferencias significativas entre las distintas muestras. Letras distintas denotan diferencias significativas entre las muestras (n=9 plantas; **=p<0,5).



El efecto de CNX1 sobre los niveles de GUS y GFP se presenta en la figura 22, donde puede observarse que la actividad GUS aumentó un 750% mientras que los niveles de GFP se duplicaron en presencia de CNX1 con respecto al control. Los ensayos realizados en presencia del supresor de silenciamiento p19 permiten descartar que el efecto producido por la construcción CNX1 se deba a la presencia de p19 en el vector pEAQ-HT-DEST1.

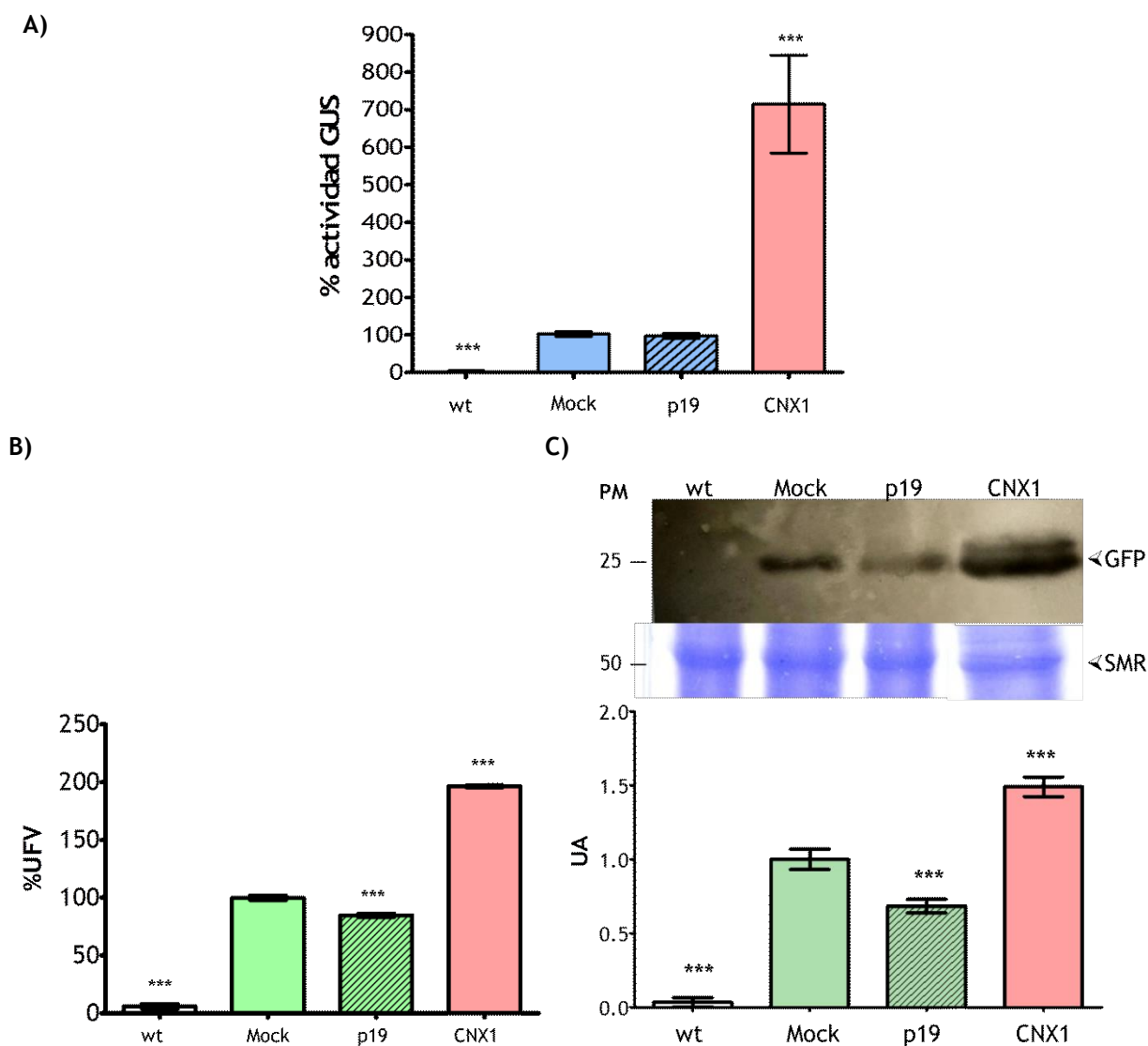


Figura 22: Efecto de la sobre-expresión de la chaperona CNX1 sobre los niveles de GUS Y GFP. Se evaluaron los niveles de acumulación de la enzima β -glucuronidasa (RE-GUS) y de la proteína fluorescente verde (RE-GFP) en presencia y ausencia de la proteína CNX1. Los niveles de GUS se evaluaron por determinación de actividad enzimática (panel A) y los niveles de GFP se evaluaron por cuantificación de fluorescencia verde (%UFV) e inmunoensayo (paneles B y C). Para ambas proteínas reporteras, se observó un aumento en los niveles de acumulación en presencia de CNX1. Los niveles de GUS aumentaron un 750%, mientras que para GFP se registró un aumento del 200% en presencia de CNX1. Para ambas proteínas reporteras se ensayó también el efecto de p19, el cual no mejoró los niveles de acumulación de ninguna de ellas con respecto al control (Mock). Para todas las medidas, se utilizó la misma cantidad de proteína soluble total para cada muestra: 1mg para GUS y 100 μ g para GFP. Para el inmunoensayo para GFP, se utilizó a la subunidad mayor de la RuBisCo (SMR) como control de carga, tal como se muestra en la tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250. El patrón de peso molecular (PM) se expresa en kDa y se muestra en el lateral de la figura. La intensidad de banda se cuantificó por densitometría. Se realizaron tres ensayos independientes para cada proteína reportera, utilizando para cada uno hojas de tres plantas diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizó un test de ANOVA posterior test de Dunnet para analizar diferencias significativas entre las muestras y el control (Mock) (**= $p < 0,01$).

Estos resultados, indican que la sobre-expresión de chaperonas del retículo endoplásmico como Calnexina1 pueden incrementar los niveles GUS y GFP.

Efecto de la sobre-expresión de los genes candidatos sobre los niveles de acumulación de anticuerpos en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Se evaluó el impacto de los genes efectores sobre la producción de un anticuerpo simple cadena y un anticuerpo monoclonal tetramérico (figura 15). Estas proteínas necesitan de la acción de chaperonas y foldasas para alcanzar su conformación final, ya que requieren de la formación de puentes disulfuro y del ensamblado de las distintas cadenas que conforman al anticuerpo. Los efectores seleccionados en base a los resultados anteriores fueron los factores bZIP60 Δ C y bZIP28 Δ C y la proteína CNX1.

Efecto de la sobre-expresión de los genes candidatos en la acumulación de un anticuerpo simple cadena.

Se utilizó el anticuerpo simple cadena (scFv) específico de transglutaminasa tisular humana (htTG) 2G3, fusionado a RFP (ER-RFP-2G3) [151] (figura 15) para ensayos de expresión transitoria en presencia o ausencia de los efectores seleccionados. Los resultados de estos ensayos se presentan en la figura 23 y mostraron que los niveles de fluorescencia roja (figura 23A) en los extractos es mayor cuando provienen de hojas co-infiltradas con bZIP28 Δ C y CNX1. Este resultado es coincidente con los niveles alcanzados por las proteínas reporteras ensayadas previamente en presencia de estos efectores. El supresor de silenciamiento p19 no modificó los niveles de fluorescencia roja con respecto al control, mientras que la presencia del bZIP60 Δ C, en cambio, disminuyó los niveles de fluorescencia medidos. Para poder correlacionar estas medidas de fluorescencia roja con los niveles de acumulación del anticuerpo simple cadena, se procedió a confirmar la integridad de la fusión de este anticuerpo a RFP en los extractos utilizados por inmunoensayo usando un anticuerpo específico para RFP (figura 23B). Este inmunoensayo reveló una banda de aproximadamente 66kDa que coincide con el peso esperado para la fusión de esta proteína fluorescente con el anticuerpo simple cadena y la intensidad de banda obtenida parece ser mayor en presencia del bZIP28 Δ C, correlacionando con las medidas de fluorescencia. El impacto de los efectores sobre los niveles de RE-RFP-2G3 también fue evaluado por inmunoensayo utilizando un anticuerpo anti-His (figura 23C). Los resultados de este ensayo mostraron niveles detectables del anticuerpo simple cadena únicamente en presencia del bZIP60 Δ C en combinación con p19, del bZIP28 Δ C y de la Calnexina1. Para el resto de las condiciones, los niveles del anticuerpo fueron tan bajos que no llegaron a ser detectados utilizando esta técnica. El peso molecular de las bandas detectadas en este ensayo se corresponde con el obtenido para el inmunoensayo realizado para RFP.

Estos resultados, en su conjunto demuestran que es posible aumentar los niveles del anticuerpo simple cadena 2G3 utilizando como estrategia la sobre-expresión del factor bZIP28 Δ C o de la Calnexina1.

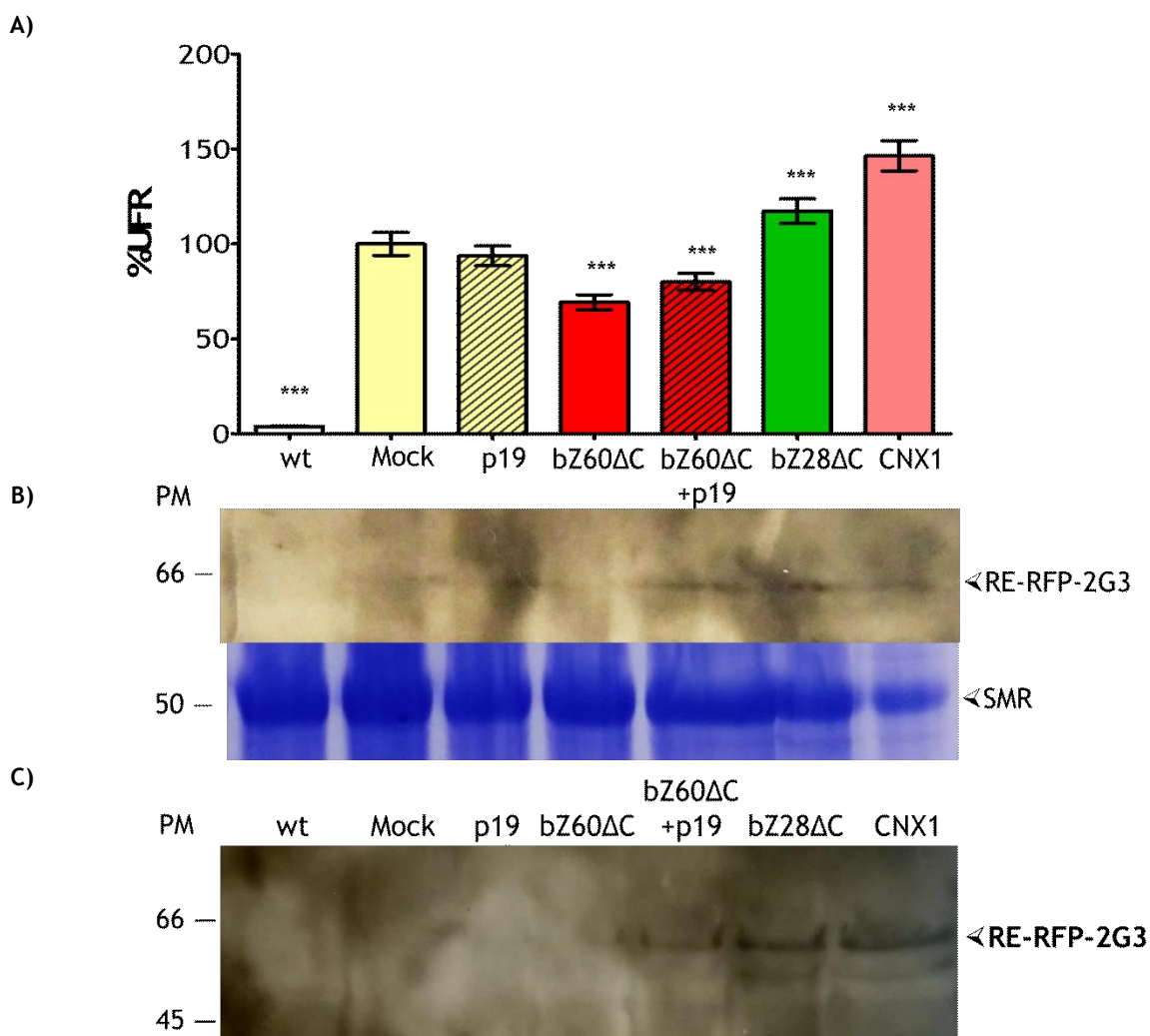


Figura 23: Efecto de los distintos efectores estudiados sobre la acumulación de un anticuerpo simple cadena. Se evaluaron los niveles de acumulación del anticuerpo simple cadena 2G3 fusionado a RFP (RE-RFP-2G3) por cuantificación de fluorescencia roja (A) e inmunoensayo para RFP (B). Dado que el anticuerpo posee un tag de histidinas, también se realizó un inmunoensayo contra este tag (C). Los resultados de cuantificación de fluorescencia roja presente en los extractos, fueron mayores en presencia del factor bZIP28ΔC y Calnexina1, lo que indicaría mayores niveles de acumulación del anticuerpo (A) El factor bZIP60ΔC y el supresor de silenciamiento p19 no parecen incrementar los niveles de RFP presentes en el RE ya sea de manera independiente o conjunta. La fusión del anticuerpo simple cadena a la proteína RFP, fue confirmada por inmunoensayo (B), el cual reveló bandas de un peso molecular de aproximadamente 66kDa, lo que se corresponde con el peso esperado para dicha fusión (RE-RFP-2G3). El inmunoensayo contra el tag de histidinas fusionado al anticuerpo simple cadena, mostró resultados coincidentes con los niveles de fluorescencia roja, observándose un aumento en los niveles de esta proteína en presencia del factor bZIP28ΔC y Calnexina1, de manera que sólo se logra detectar el anticuerpo en presencia de estos factores. La presencia del factor bZIP60ΔC en conjunto con el supresor de silenciamiento p19 también aumentaron los niveles del anticuerpo hacia valores detectables por inmunoensayo. La banda correspondiente al RE-RFP-2G3, detectada con el anticuerpo anti-His coincide en tamaño con la detectada en el inmunoensayo con el anticuerpo anti-RFP. Los niveles de fluorescencia roja fueron determinados en 100μg de proteína soluble total para cada muestra y se representan como porcentaje de unidades de fluorescencia roja con respecto al control (%UFR). Se realizaron dos ensayos independientes, utilizando para cada replicado, hojas de tres plantas diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizó un test de ANOVA y un test de comparaciones múltiples de Dunnet para comparar las muestras estadísticamente con respecto al control. (n=6; ***p<0,01). Para los inmunoensayos se sembró la misma cantidad de muestra en cada calle y se utilizó a la subunidad mayor de la RuBisCo (SMR) como control de carga, tal como se muestra en un gel teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250. El patrón de peso molecular (PM) se expresa en kDa y se muestra en el lateral de la figura. Se utilizaron los mismos extractos para los 3 ensayos realizados.

Efecto de la sobre-expresión de los genes candidatos sobre los niveles de acumulación de un anticuerpo tetramérico completo en *Nicotiana benthamiana*.

Para estudiar los efectos de los factores de transcripción bZIP y la proteína Calnexina1 sobre anticuerpos completos, se utilizó como modelo el anticuerpo monoclonal 14D9 co-infiltrándose las construcciones que llevan los genes codificantes para las cadenas liviana y pesada de este anticuerpo (figura 15) [155] con los efectores bZIP60ΔC, bZIP28ΔC y Calnexina1. En la figura 24 se muestran los resultados de este estudio donde se puede ver que el anticuerpo completo se ensambla correctamente, dando una banda de aproximadamente 160kDa, coincidente con el tamaño esperado para la forma tetramérica (HC₂LC₂) glicosilada de dicha molécula. Este inmunoensayo revela también una banda de 50kDa, que podría tratarse de la cadena pesada del anticuerpo (HC). Para este ensayo, la intensidad de las bandas reveladas no mostró grandes diferencias, como si ha ocurrido con el anticuerpo simple cadena. Sin embargo, pareciera haber mayor acumulación del anticuerpo en presencia de la proteína Calnexina1, lo cual coincide con los demás resultados obtenidos en esta tesis en donde la presencia de esta chaperona permitió aumentar los niveles de las proteínas reporteras.

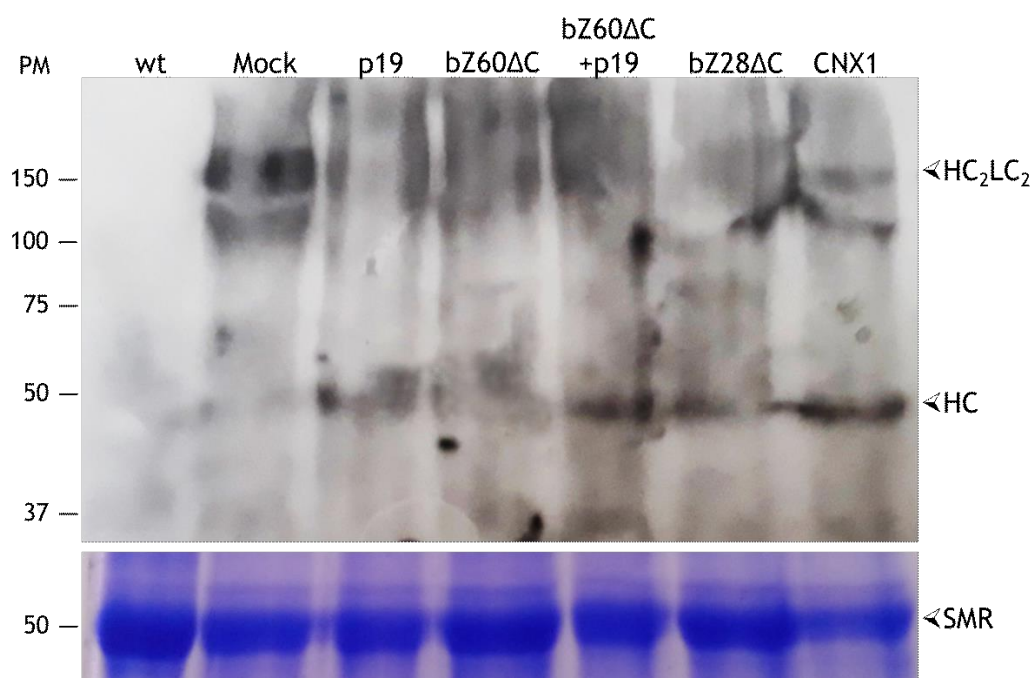


Figura 24: Efecto de la acumulación de un anticuerpo monoclonal completo de ratón (14D9) en presencia o ausencia de los efectores en estudio. Se realizó un inmunoensayo con un anticuerpo anti-ratón de extractos de hoja de *Nicotiana benthamiana* que expresaban el anticuerpo 14D9 solo o en presencia de los efectores estudiados. Los resultados obtenidos mostraron que el anticuerpo 14D9 se ensambla correctamente, observándose una banda de aproximadamente 160kDa correspondiente al peso del anticuerpo completo (HC₂LC₂). Además se observa una banda de aproximadamente 50kDa que se correspondería con la cadena pesada del anticuerpo (HC). Según la intensidad de las bandas observadas, se podría concluir que hay mayor acumulación del anticuerpo 14D9 en los extractos con Calnexina1 (CNX1). La subunidad mayor de la RuBisCo (SMR) fue utilizada como control de carga, tal como se muestra en la tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250. El patrón de peso molecular (PM) se expresa en kDa y se muestra en el lateral de la figura. (n=6)

Estos resultados indican que el anticuerpo tetramérico 14D9 se ensambla correctamente y que la chaperona Calnexina1, podría aumentar sus niveles de acumulación en extractos de hojas de *N. benthamiana*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir que tanto el factor de transcripción bZIP28ΔC como la chaperona Calnexina1, son capaces de provocar un incremento en los niveles de acumulación de moléculas complejas como son el anticuerpo simple cadena 2G3 y el anticuerpo monoclonal 14D9 estudiados en esta sección.

DISCUSIÓN



El desarrollo de los sistemas de expresión basados en plantas para la producción de proteínas recombinantes constituye un paradigma tanto en la producción de biológicos como de proteínas con diversas aplicaciones como son la investigación médica, la medicina regenerativa, la terapia celular y la cosmética, como así también las destinadas a la producción de biocombustibles, fabricación de papel, detergentes y el procesamiento de alimentos [29]. El uso de esta tecnología se consolidó en distintos mercados gracias a algunas ventajas que permitían lidiar con las fallas de los sistemas tradicionales, como por ejemplo la rápida escalabilidad de la producción [156], la capacidad de síntesis de moléculas que no se sintetizan eficientemente en otros sistemas [15] y la ausencia de endotoxinas y seguridad intrínseca [157]. Otra ventaja del uso de las plantas como sistema de expresión es que son sustentables y amigables con el medio ambiente por lo que se espera contribuyan a la bioeconomía del futuro. Un factor que ha sido clave en el desarrollo de este tipo de plataformas, es el bajo costo tanto en la producción de biomasa, como de infraestructura y del proceso *downstream* [158]. Un área de investigación en desarrollo en cuanto a los sistemas de expresión basados en plantas a una escala comercial, es la aplicación de los recientes avances en la tecnología de iluminación LED que permiten manipular la calidad de la luz utilizada en el crecimiento. En la actualidad existe muy poca información acerca del efecto de la calidad y cantidad de luz sobre la producción de proteínas recombinantes por lo que éste fue uno de los objetivos de este trabajo.

A pesar de que se han desarrollado varias herramientas que facilitan el cultivo industrial de plantas de *Nicotiana benthamiana* y que se han introducido mejoras en la técnica de agroinfiltración para transformaciones a gran escala, la información sobre las características de los sistemas de iluminación empleados es limitada [159]. La aplicación de la tecnología LED a nivel industrial ha tomado impulso en horticultura desde el año 2013, sin embargo el conocimiento de las condiciones óptimas de iluminación en cuanto a composición del espectro e intensidad de luz para obtener altos rendimientos de productos con las características fisicoquímicas deseadas es aun escaso [160]. Por esta razón, se decidió analizar el efecto de la calidad y cantidad de luz emitida por dos tipos de chips LED diferentes comparados con tubos fluorescentes (A14%, V37%, R42%, RL7%), sistema de iluminación que ya se venía utilizando en nuestro grupo de investigación. Para ello, se construyeron dos sistemas de iluminación; uno formado por chips LED rojos y azules en relación 2:1 y otro con chips LED *Full Spectrum* (A25%, V2,2%, R70%, RL2,8%) que son muy utilizados en cultivo de interiores. El diseño de estos sistemas de iluminación tuvo en cuenta los datos disponibles; por ejemplo, la descripción de los cuartos de cultivo para *Nicotiana benthamiana* de la planta industrial de Caliber Biotherapeutics quienes utilizan sistemas de crecimiento vertical integrado por luces LED rojas (75%) y azules (25%) para crecer plantas con hojas de mayor tamaño de que el obtenido con luces LED blancas frías [159]. Sin embargo, la información técnica no fue suficiente para poder repetir esas condiciones.

El diseño del sistema de iluminación también se basó en que la densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF) debe estar en un rango comprendido entre 80 y 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ [135], [140], [161]-[163] para lo cual, teniendo en cuenta los datos técnicos de los LED provistos por el proveedor, (Bigliati, Ingeniería en Informática, Argentina) se estimó que colocando 9 chips por estante se alcanzaría una intensidad de luz de aproximadamente 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (tabla 6) lo que nos daría margen para modificar este parámetro si hiciera falta. La determinación de la DFFF real se realizó empleando un sensor PAR (Cavadevices, Argentina) a distintas distancias y posiciones en las bandejas contenedoras de las plantas y permitió realizar un análisis de la intensidad de luz alcanzada para cada sistema de iluminación diseñado. Los resultados mostraron que con los LED *Full Spectrum* se alcanzaron valores de hasta 220 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (en el centro del estante, a 13cm del LED), mientras que con los LED Rojo-Azul, no se superaban los 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (a igual distancia y posición). Además, se observó que los chips LED poseen una caída más abrupta de la intensidad de luz con la distancia respecto de la fuente y que la distribución en el plano xy era mucho más heterogénea que la obtenida con los tubos fluorescentes con los que se alcanzaron DFFF de 135 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (a 13cm de la fuente). Estos valores, aunque difieren de los esperados permitieron realizar los ensayos posteriores de crecimiento y expresión.

Una de las ventajas de la tecnología LED es que se puede ajustar la calidad y cantidad de luz para obtener plantas con determinadas características. En el caso de la producción de proteínas recombinantes en hojas es importante el área foliar. Estudios realizados en el Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology (FhCMB) mostraron que con una relación R(660nm)/RL(730nm) de 1,2 se obtenían plantas de tamaño adecuado para infiltrar en 3 semanas mientras que con tubos fluorescentes se requerían 4 semanas para alcanzar ese mismo nivel de crecimiento. Además mostraron que una relación R(660nm)/A(450nm) de 2,7 permitía generar hojas más grandes que con tubos fluorescentes o una relación R/A de 0,7 [164]. En este trabajo se emplearon relaciones R/A de 3 (para los tubos fluorescentes), de 2,8 (para los LED *Full Spectrum*) y de 2 (LEDs Rojo-Azul) y relaciones R/RL de 7 (para los tubos fluorescentes), de 14 (para los LED *Full Spectrum*) y tendientes a infinito (para los LED Rojo-Azul), trabajándose además a una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad de $60\pm 10\%$ y ciclos de luz-oscuridad de 16:8hrs. En estas condiciones las plantas se encontraban listas para infiltrar en 4 semanas. Además se observó que las plantas crecidas bajo los tubos fluorescentes y las luces LED *Full Spectrum* presentaron una coloración verde oscura, una altura promedio cercana a los 8cm y varias hojas grandes de un diámetro promedio de alrededor de 7cm. El aspecto de estas plantas era más saludable que el de aquellas crecidas bajo luces LED Rojo-Azul que presentaron un color verde claro, amarillento, hojas pequeñas cuyo diámetro no superaba los 4cm, una altura promedio superior a 9cm y botones florales. Teniendo en cuenta que la clorofila tiene dos picos de absorción, uno en la región azul cercana a los 450nm y otro en la región roja cercana a los 660nm [165] se esperaría que las plantas crezcan mejor bajo las luces LED Rojo-Azul alcanzando mayores tasas fotosintéticas [166], [167], sin embargo los resultados demuestran lo contrario. Esto puede deberse a que los valores de DFFF emitida por este tipo de luz no superan los $70\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, valores para los cuales la tasa fotosintética es baja, siendo máxima a los $200\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ [34], es decir a valores cercanos a los registrados para las luces LED *Full Spectrum* y tubos fluorescentes. Además, la composición espectral de cada una de las luces es también un factor importante que influye sobre el crecimiento de las plantas: las luces LED Rojo-Azul no emiten luz en el rojo lejano (730nm), la cual si bien no entra en el rango de radiación PAR, puede inducir vías de señalización en las células vegetales impactando en el crecimiento y desarrollo de la planta [164]. Por otro lado, los tubos fluorescentes poseen mucha mayor componente verde (37%) con respecto a los LED *Full Spectrum* (2,2%), la cual si bien no es la más eficiente, es la que más penetra en el tejido foliar llegando al mesófilo esponjoso, dando así mayor capacidad fotosintética, lo que podría traducirse en una mayor tasa de crecimiento [36]. Otro factor a tener en cuenta es el fotoperíodo. En muchos casos, las horas de luz se extienden a 24 horas maximizando de esa manera la cantidad de luz emitida por día (DLI), induciendo un mayor crecimiento de la planta y expansión del área foliar [168], [169] (<https://www.waveformlighting.com/horticulture/>). A pesar de los buenos antecedentes de la combinación de luces LED rojas y azules para el crecimiento de las plantas [159], [170], [171], en nuestro caso las plantas crecidas bajo este tipo de luz no mostraron un aspecto saludable, sugiriendo que este sistema de iluminación requiere mejoras. En contraposición, los tubos fluorescentes y las luces LED *Full Spectrum* parecen ser buenas condiciones de luz para el crecimiento de las plantas *Nicotiana benthamiana* según los parámetros evaluados.

La medida del contenido relativo de agua (CRA) que da idea del estado hídrico de las plantas, que depende de la apertura de estomas, intercambio gaseoso, transporte de agua y otros procesos metabólicos (Gonzalez & Gonzalez-Vilar, 2001; Turner, 1981) dio un valor promedio de 97,5% para las plantas crecidas bajo los tubos fluorescentes blancos y 94,9% para las luces LED *Full Spectrum*, los cuales no representan diferencias significativas. Este parámetro, ha sido muy utilizado para estudiar especies vegetales resistentes a distintos tipos de estrés biótico y abiótico (Dastogeer, Li, Sivasithamparam, & Jones, 2017; Ritchie, Nguyen, & Holaday, 1990; Toscano, Farieri, Ferrante, & Romano, 2016), registrándose valores de CRA menores al 80% en plantas sometidas a estrés [172], [173]. A partir de estos datos, se podría decir que las condiciones lumínicas ensayadas no alteran el estado hídrico de las plantas. Este no es un dato menor, ya que las luces son también una fuente de calor que podría aumentar la temperatura de la planta, lo cual tendría un impacto directo en el CRA sin embargo este efecto no se observa.

Además del estudio de las diferentes condiciones de luz sobre el crecimiento de las plantas, se evaluaron los niveles de acumulación de proteínas recombinantes en *Nicotiana benthamiana* crecidas bajo las distintas luces ensayadas. Los niveles de acumulación de la enzima β -glucuronidasa y la proteína fluorescente verde mostraron que la producción de estas proteínas reporteras es al menos tres veces mayor en plantas crecidas bajo tubos fluorescentes con respecto a aquellas crecidas bajo los chips LED *Full Spectrum*. Los chips LED Rojo-Azul en cambio, mostraron resultados diferentes para cada una de las proteínas reporteras estudiadas, siendo los niveles de GFP cercanos a los obtenidos bajo los tubos fluorescentes, mientras que para GUS los niveles fueron comparables con los obtenidos con las luces LED *Full Spectrum*. Si bien según estos resultados, las luces LED Rojo-Azul fueron óptimas para la producción de buenos niveles de GFP, no lo fueron para GUS. Sumado a esto, las plantas crecidas bajo este tipo de luz no tenían buen aspecto, no desarrollaron buenas hojas y muchas florecieron tempranamente no pudiendo ser agroinfiltradas, por lo que esta condición de luz se descartó para ensayos posteriores. Por otro lado, los resultados de GUS y GFP coinciden en que las luces LED *Full Spectrum* no son una buena condición para la producción de proteínas heterólogas a pesar de que las plantas hayan crecido saludablemente bajo este tipo de luz. Las luces LED *Full Spectrum* tienen un 70% de componente roja, mientras que los tubos fluorescentes tienen solo un 42% por lo que según Murase et al. (2018) [138], los niveles de acumulación de GFP deberían mejorar bajo las LED en al menos un 27%. Esto no se observa en los resultados obtenidos en este trabajo, probablemente debido a que las luces LED a pesar de tener mayor componente roja, carecen de componente verde. Los tubos fluorescentes en cambio, poseen un 37% de emisión de este tipo de luz, pudiendo penetrar más en los tejidos y favoreciendo el desarrollo del mesófilo, aumentando en consecuencia los niveles de proteína recombinante [36], [37]. Además, se debe tener en cuenta que si bien para estos ensayos el mínimo de intensidad de luz se fijó en $150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, las medidas de radiación PAR, mostraron que la intensidad de luz en los LED *Full Spectrum* aumentaba considerablemente a medida que se acortaba la distancia hacia la fuente de luz. Esta situación no se observó para los tubos fluorescentes para los cuales los valores de PAR se mantuvieron aproximadamente constantes para las distancias ensayadas. Este fenómeno pudo haber derivado en una disminución de los niveles de proteína recombinante para las luces LED *Full Spectrum* provocada por situaciones de estrés como la fotoinhibición o quizás por silenciamiento del transgen, dado que se ha reportado que mayores intensidades de luz pueden ocasionar este tipo de respuestas [174]. Este hecho, va en línea con los resultados obtenidos para los niveles de la chaperona BiP que demostraron ser mayores para las plantas transformadas y crecidas en los dos sistemas LED evaluados, aunque los niveles de acumulación de la proteína GUS hayan sido bajos. Esto indicaría que estas plantas, además del estrés que pudiera producir la expresión de proteínas recombinantes [106], estarían sometidas a una situación de estrés adicional bajo este tipo de iluminación con respecto a los tubos fluorescentes.

Más allá de que los resultados obtenidos en la primera sección de este trabajo conducen a que ninguno de los sistemas LED mejoró los niveles de producción de proteína recombinante obtenidos con los tubos fluorescentes, a futuro pueden realizarse otros ensayos variando las condiciones pre- y postinfiltración, como la intensidad de luz o la temperatura, lo cual puede tener un impacto positivo en la producción de proteínas heterólogas [137], [175], [176].

Por otro lado, con el creciente desarrollo y popularidad de las plantas como sistema de expresión, en los últimos años se han desarrollado diversas estrategias con el fin de aumentar la síntesis de proteínas recombinantes y elevar los rendimientos de producción [133], [177], [178]. Teniendo en cuenta este objetivo, una estrategia que se ha utilizado en otros sistemas, es la expresión de reguladores clave involucrados en el desarrollo de la vía secretoria, como han sido XBP1 en células de mamíferos y Hac1 en levaduras. Aunque en el área de *molecular farming*, la mayoría de las proteínas de interés farmacéutico e industrial, requieren de modificaciones producidas a lo largo de la vía secretoria, poco se conoce en plantas sobre el desarrollo de esta vía, por lo que este tipo de estrategias aún no han sido exploradas. El presente trabajo plantea que la sobre-expresión de ortólogos de XBP1 u otros reguladores clave, podrían ser una estrategia para mejorar los niveles de producción de proteínas heterólogas en *Nicotiana benthamiana*.

El factor XBP1 de mamíferos se ha identificado como un regulador clave en el proceso de diferenciación de células B a células secretorias profesionales, como son las células plasmáticas [127]. Dado que las células de semilla en desarrollo cuentan con una vía secretoria ampliamente desarrollada acorde a la gran cantidad de proteínas que sintetizan, pueden considerarse también células secretorias profesionales. A partir de esto, se evaluaron los niveles de expresión *in silico* de los genes codificantes para el factor de transcripción bZIP60, descrito como el ortólogo de XBP1 en plantas, y los factores bZIP17 y bZIP28, ortólogos de ATF6 e involucrados también en la respuesta a proteínas mal plegadas, a lo largo de las etapas de desarrollo de la semilla de *Arabidopsis thaliana*. Este análisis mostró que la expresión del factor bZIP60 se duplica cuando se inicia la etapa de diferenciación celular y de tejidos [149] y que dicho incremento va acompañado de un aumento de Ire1, involucrado en el procesamiento de dicho factor. Este aumento también coincide con los máximos de expresión de los genes involucrados en la UPR, lo que llevaría a pensar que la vía de transducción de esta señal se encuentra activa como un mecanismo de preparación de las células vegetales para sobrellevar la etapa de almacenamiento de nutrientes de reserva, lo cual implica un aumento en la síntesis proteica y expansión del retículo y de las células como parte del desarrollo de las semillas. Además, los genes involucrados directamente en el llenado de las semillas mostraron también un aumento de expresión a partir de esta misma etapa, alcanzando sus máximos niveles en etapas posteriores, lo cual sustenta esta hipótesis de que el bZIP60 es necesario para activar la respuesta UPR y facilitar la preparación de las células para la etapa de acumulación de nutrientes de reserva. A diferencia del bZIP60, los factores bZIP17 y bZIP28 no mostraron un aumento de expresión notorio en ninguna de las etapas del desarrollo de las semillas, probablemente debido a los distintos mecanismos de activación de la señal UPR por parte de estos factores de transcripción [108], [109], [115]. Por otro lado, hasta hace poco tiempo sólo se vinculaba a los factores bZIP17 y bZIP28 con una respuesta a proteínas mal plegadas asociadas a situaciones de estrés, tales como salinidad y no a etapas del desarrollo de *Arabidopsis thaliana* [179]. Sin embargo, actualmente existen trabajos que aseguran que en líneas mutantes del factor bZIP17 sometidas a estrés osmótico, existe una disminución en la expresión de genes asociados al almacenamiento en semillas y la germinación, sugiriendo que este factor puede estar implicado también en la regulación de estos procesos [180] (Cifuentes-esquivel et al., 2018).

Para evaluar el efecto de la sobre-expresión de los factores bZIP mencionados, se analizaron en primer lugar, los niveles de acumulación de proteínas reporteras de plegado sencillo como la enzima β -glucuronidasa y la proteína fluorescente verde en presencia y ausencia de estos efectores. Los resultados de la sobre-expresión de la forma activa del bZIP60, bZIP60 Δ C, han demostrado que en presencia de este factor, los niveles tanto de GUS como de GFP aumentan en un 50% respecto al control. Estos resultados son comparables con los obtenidos en ensayos similares en levaduras, donde la sobre-expresión del factor Hac1 produjo un aumento del 70% en los niveles de α -amilasa [181]. La misma estrategia aplicada en células CHO (Chinese hamster ovary cells) demostró también aumentar los niveles de dos proteínas reporteras secretorias: la fosfatasa alcalina de placenta humana (SEAP) y la α -amilasa derivada de *Bacillus stearothermophilus* (SAMY) a partir de su co-transfección con la versión truncada del factor XBP1, -XBP1(s)- [182]. Sin embargo, ensayos similares utilizando endoglucanasa como reportera, no mostraron diferencias en presencia del factor Hac1 en *Saccharomyces cerevisiae*. En *Pichia pastoris* la sobre-expresión de la versión truncada del factor Hac1 -Hac1(s)-, mostró resultados diversos sobre los niveles de acumulación de proteínas de la superficie celular, desde aquellas cuyos niveles no sufrieron alteración o disminuyeron en presencia de este factor de transcripción hasta aquellas cuyos niveles aumentaron al doble cuando Hac1(s) era sobre-expresado [183], sugiriendo que el éxito de esta estrategia, al menos en levaduras, dependería de la proteína de interés. Esto no fue así para las proteínas ensayadas en este trabajo, observándose el mismo efecto tanto para GUS como para GFP, por lo que las diferencias observadas pueden deberse a un efecto de la localización subcelular, siendo estas proteínas dirigidas al retículo endoplásmico por la señal KDEL [82], lugar donde estos factores actúan como transductores de la señal UPR [108]. Más allá del análisis de las proteínas reporteras, se analizaron también los niveles de BiP, los cuales aumentaron en presencia del bZIP60 Δ C en extractos de hojas transformadas con los genes reporteros. Estos resultados en su conjunto, son

indicio de que el factor bZIP60 Δ C de *Arabidopsis thaliana* reconoce secuencias reguladoras de la transcripción de genes de *Nicotiana benthamiana*, pudiendo activar la respuesta UPR en ensayos de expresión transitoria en esta especie y aumentando los niveles de acumulación de las proteínas reporteras sencillas, mejorando la capacidad de síntesis y plegado de este tipo de proteínas en las células vegetales transformadas.

Por otro lado, los niveles de acumulación de GUS y GFP mostraron diferencias importantes a partir de la sobre-expresión de los dos factores bZIP descritos como ortólogos de ATF6 en plantas: bZIP17 y bZIP28 Δ C. Para el caso del bZIP17, no se vieron efectos positivos a partir de la sobre-expresión de este factor sobre los niveles de GUS o GFP, sin embargo, los niveles de ambas proteínas reporteras aumentaron en al menos un 50% en presencia del bZIP28 Δ C, valores que coinciden con los obtenidos con el factor bZIP60 Δ C. Los resultados obtenidos con el bZIP17, podrían asociarse a que para estos ensayos se utilizó la versión completa de este factor y no la versión truncada que es su forma activa dado que ensayos similares a este, mostraron que la forma completa de este tipo de factores bZIP no generan modificaciones en los niveles de acumulación de proteínas heterólogas [182]. Esto podría deberse probablemente a que no ha habido un estímulo suficiente que active la respuesta UPR por lo que el bZIP17 no podría ser clivado dentro de la célula para dar lugar a la forma activa. Sin embargo, los resultados de los niveles de BiP en presencia del factor bZIP17, mostraron que los niveles de esta chaperona aumentaron en presencia de este factor a niveles comparables con los obtenidos en presencia del bZIP60 Δ C, lo que indicaría activación de la respuesta UPR. Tradicionalmente, la sobre-expresión del factor bZIP17 en plantas se ha relacionado con la tolerancia a distintos tipos de estrés [111], [115], [184], pero se ha reportado también que en situación de estrés salino, la señal UPR clásica no es activada y que el factor bZIP17 activa un grupo de genes que no responden a inductores clásicos del estrés en el retículo y de la señal UPR como es el DTT [115]. Sumado a esto, estudios con líneas mutantes en el gen que codifica para el factor bZIP17 han demostrado que este factor de transcripción tiene un rol fisiológico importante en el desarrollo de las plantas, relacionado con procesos como el crecimiento celular y la elongación de raíces [114], [185]. Estos antecedentes junto con los resultados obtenidos en este trabajo, van en línea con la teoría de que el factor bZIP17 activa una señal de UPR diferente que aquella desencadenada por los factores bZIP60 y bZIP28 y probablemente esta sea la razón por la cual no se vea un efecto sobre la acumulación de proteínas recombinantes.

En contraposición a lo observado con el factor bZIP17, la sobre-expresión del factor bZIP28 Δ C produjo grandes cambios en los niveles de acumulación de las proteínas reporteras evaluadas. Los niveles de actividad GUS se incrementaron en un 300% en presencia del bZIP28 Δ C, mientras que los niveles de GFP aumentaron sólo en un 50%. Estos resultados podrían deberse a que la secuencia codificante para este factor se encuentra clonada en el vector de expresión pEAQ-HT-DEST1 [154], [186]. Este vector se ha utilizado con el fin de lograr altos niveles de expresión del gen de interés y contiene elementos regulatorios que contribuyen a este objetivo, como la región 5' no traducida del RNA-2 del virus del mosaico del poroto (CPMV) modificada. Esta secuencia puede actuar en *cis*- mejorando los niveles de expresión del factor bZIP28 Δ C y en consecuencia aumentar los niveles de las proteínas reporteras. Por otro lado, la similitud de los resultados obtenidos entre el bZIP28 Δ C y el bZIP60 Δ C para los niveles de acumulación de GFP podría explicarse a partir del hecho de que estos factores de transcripción pueden formar heterodímeros y podrían solaparse en la regulación de algunos de sus genes blanco, por lo que la sobre-expresión de uno u otro, genera el mismo efecto sobre la acumulación de GFP [187]-[189]. Otro aspecto a tener en cuenta en el análisis de los resultados obtenidos con el factor bZIP28 Δ C, es que este factor de transcripción podría tener una participación "dual" tanto en la señal UPR temporal o canónica como en una señal UPR fisiológica o no-canónica [185], pudiendo inducir cambios fisiológicos en la célula vegetal, similares a los observados en células CHO en donde la sobre-expresión del factor ATF6 dio lugar a una expansión del retículo endoplásmico [190].

Siendo el plegado de proteínas un "cuello de botella" que puede afectar el rendimiento de la producción de moléculas de interés, la sobre-expresión de Calnexina1 como chaperona nativa del retículo endoplasmático ha sido otra estrategia estudiada para aumentar los niveles de acumulación de proteínas [102]. Los resultados mostraron que en presencia de esta chaperona, los niveles de

acumulación de GUS aumentaron un 700% con respecto al control, mientras que los niveles de GFP se duplicaron en presencia de CNX1. Dado que la secuencia que codifica para Calnexina1 se encuentra clonada en el vector pEAQ-HT-DEST1 al igual que el factor bZIP28ΔC, puede que los altos niveles de acumulación se deban también a la presencia de los elementos regulatorios mencionados anteriormente en este vector binario. Esta posibilidad se ve reforzada por el hecho de que el aumento observado para ambas proteínas reporteras se correlaciona con el alcanzado en presencia del bZIP28ΔC, siendo los niveles de GUS mucho más altos que los de GFP. Sin embargo, la sobre-expresión de Calnexina1 en *Hansenula polymorpha*, ha provocado aumentos del doble o el triple en los niveles de acumulación de diferentes proteínas reporteras [191], mostrando que es posible que el efecto observado en este trabajo, pueda deberse a la sobre-expresión de esta chaperona y no únicamente a efectos de los elementos regulatorios del vector binario. Otras chaperonas han sido también sobre-expresadas en otros sistemas como levaduras para la producción de hirudina antitrombótica [192], o de taumatina en el hongo *Aspergillus awamori* [193] alcanzándose niveles comparables con los obtenidos para GFP en el presente trabajo, lo cual da evidencias de que es una estrategia válida para mejorar los niveles de producción de proteínas heterólogas.

El impacto de la sobre-expresión de los factores bZIPs y la Calnexina1, fue luego evaluado sobre los niveles de acumulación de proteínas más complejas, como el anticuerpo simple cadena 2G3 y el anticuerpo multimérico 14D9, que requieren de la acción de foldasas, proteínas disulfuro isomerasas y otras chaperonas para su correcto plegado y ensamblado. Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de acumulación del anticuerpo simple cadena 2G3 fueron mayores en presencia del factor bZIP28ΔC y la Calnexina1. El inmunoensayo con un anticuerpo anti-RFP, permitió correlacionar las medidas de fluorescencia roja con el anticuerpo 2G3, cuyo peso molecular también coincidió con el tamaño de las bandas reveladas por el inmunoensayo realizado con el anticuerpo anti-His. La sobre-expresión de los factores mencionados, permitió que el anticuerpo 2G3 alcanzara niveles detectables para este último inmunoensayo. Estos resultados, se correlacionan con los obtenidos para los niveles de acumulación del anticuerpo 14D9 completo y su cadena pesada, que fueron mayores en el extracto en el cual se sobre-expresó la Calnexina1, según lo revelado por la intensidad de bandas del inmunoensayo. Este estudio también va de acuerdo con trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio que han demostrado que este anticuerpo es correctamente ensamblado en las células vegetales [82], [155].

La sobre-expresión de los factores del tipo bZIP utilizados en este trabajo con el fin de aumentar los niveles de producción de proteínas recombinantes, ha sido ensayada también en otros sistemas de expresión para la producción de anticuerpos. En levaduras, la sobre-expresión del factor Hac1, produjo un aumento de 1,3 veces en la producción del fragmento de unión al antígeno (Fab) de un anticuerpo anti-HIV1. En células CHO la sobreexpresión de XBP-1, aumentó los niveles de un anticuerpo IgG en un 40% [194]. Estos antecedentes demuestran que la sobre-expresión de estos efectores, mejoran los niveles de acumulación de anticuerpos en otros sistemas pero que dicho aumento no es tan grande como el observado para proteínas reporteras de síntesis y plegado más sencillo, tal como se observa también a partir de los resultados reportados en este trabajo de tesis. La sobre-expresión de chaperonas cuya expresión es inducida por los transductores de señal de la respuesta UPR como son los bZIPs, también se ha utilizado para la síntesis de proteínas heterólogas más complejas en otros sistemas de expresión. Por ejemplo en *S. cerevisiae* los niveles de un anticuerpo simple cadena se incrementaron hasta 8 veces utilizando como estrategia la co-expresión de BiP y PDI [195]. Sin embargo existen escasos trabajos en los que se haya evaluado la sobre-expresión de Calnexina1. En este trabajo, esta chaperona ha producido aumentos comparables al efecto producido por BiP o PDI, para la enzima β-glucuronidasa (GUS), aunque este efecto no se observó para los anticuerpos ensayados.

La estrategia desarrollada en este trabajo pretende utilizar efectores que se han descrito como ortólogos de reguladores clave en la diferenciación de células secretorias profesionales como el bZIP60 (ortólogo de XBP1), para aumentar los rendimientos de producción de proteínas heterólogas. Estos efectores, son a su vez transductores de señal que activan la señal UPR, aunque se han descrito vías alternativas que logran también inducir esta respuesta, como por ejemplo la expresión de proteínas virales. Se ha demostrado que la infección con virus induce la expresión del

bZIP60, al igual que proteínas del retículo como BiP, Calnexina1 y Calmodulina. Algunos ejemplos de proteínas que causan este efecto son la proteína de movimiento TGBp3 del virus X de papa (Potato virus X, PVX) [196], la proteína de unión a membrana 6K2 del virus del mosaico de nabo (Turnip mosaic virus, TuMV) [197], la proteína P10 de la cápside del virus enano de rayas negras de arroz (Rice black-streak dwarf virus, RBSDV) [198] y la proteína de movimiento P11 del virus X de ajo (Garlic virus X, GarVX) [199]. La activación de la respuesta UPR es inducida por el mismo virus durante la infección con el objetivo de maximizar la producción de proteínas virales, para lo cual es necesario que se produzca una expansión del sistema de endomembranas de la célula huésped [200]. De esta manera la respuesta UPR permitiría sobrepasar una situación de estrés en el retículo provocada por la síntesis y acumulación de proteínas virales. Algunos trabajos demuestran que la expresión de proteínas virales, no solo activan los transductores de señal ya descritos para la respuesta a proteínas mal plegadas, sino que también producen una expansión del retículo endoplásmico [199], [201]. Por otro lado, se cree que la respuesta a proteínas mal plegadas, es útil en la célula huésped para regular la citotoxicidad y alivianar la carga de proteínas virales en el retículo durante la infección viral. De esta manera se evita un cuadro de estrés, que siendo prolongado podría llevar a la muerte celular [199], [202]. En este sentido, la activación de UPR por parte de proteínas virales puede ser un mecanismo de defensa para frenar la infección que conlleva a cambios estructurales en el retículo endoplásmico [201].

La expansión de las membranas intracelulares a partir de la expresión de los transductores de señal de la respuesta UPR se ha descrito también en otros sistemas de expresión, como células CHO y levaduras, [183], [203] y ocurre naturalmente en importantes procesos fisiológicos tal como la diferenciación de células plasmáticas, donde el mayor protagonista es XBP1 [126]. Sin embargo, se ha descrito que en células CHO, el factor ATF6, ortólogo de bZIP17/28 es también capaz de generar una expansión del retículo por una vía independiente [204]. En levaduras, se han utilizado también otras estrategias de ingeniería genética que favorecieron la expansión del retículo, dando lugar a una mayor acumulación de proteínas recombinantes [130].

A partir de lo expuesto en esta discusión, se puede decir que existen antecedentes que aseguran que la activación de los transductores de la señal UPR puede delegar en la expansión del sistema de endomembranas. Además, los ortólogos de animales y levaduras de estos factores de transcripción han demostrado ser útiles a la hora de incrementar los niveles de acumulación de proteínas recombinantes en dichos sistemas. Sin embargo, no se han reportado aún trabajos que utilicen la sobre-expresión de factores involucrados en la respuesta UPR y el plegado proteico para mejorar los niveles de acumulación de proteínas recombinantes en plantas.

Este trabajo demostró que la sobre-expresión de los factores bZIP60 y bZIP28 en sus formas activas (bZIP60 Δ C y bZIP28 Δ C) y la Calnexina1, son capaces de aumentar los niveles de proteínas sencillas como la enzima β -glucuronidasa y la proteína fluorescente verde, así como también de anticuerpos completos o simple cadena en *Nicotiana benthamiana*, superando así una limitación en la síntesis y/o plegado de las proteínas reporteras ensayadas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS



De las condiciones de iluminación evaluadas en este trabajo para crecer las plantas de *Nicotiana benthamiana* y para producir las proteínas reporteras GUS y GFP, el uso de tubos fluorescentes bajo una densidad de flujo fotónico $155 \pm 5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ permitió obtener mayores rendimientos. El sistema de iluminación LED *Full Spectrum* permitió un buen crecimiento de las plantas, sin embargo los rendimientos de proteínas reporteras fueron bajos. El sistema LED Rojo-Azul utilizado fue inadecuado para el crecimiento de las plantas. Sin embargo los niveles de acumulación de las proteínas reporteras ensayadas no fueron tan bajos considerando que las plantas utilizadas en los ensayos no presentaban un buen estado fisiológico. A futuro, se prevé evaluar el empleo de combinaciones de las distintas luces en las etapas pre- y post-transformación e incrementar el período de luz a 24 horas a fin de reducir la potencia de los LED evitando de esta manera posibles fluctuaciones de temperatura en las hojas que pueden afectar los resultados.

El estudio de diferentes reguladores del desarrollo de la vía secretoria permitió confirmar la hipótesis de que la acumulación de proteínas foráneas en esta vía se encuentra limitada. La expresión de la forma activa del ortólogo de ATF6, el bZIP28 Δ C, o de la chaperona calnexina1 incrementó los rendimientos de GUS y GFP, como también de moléculas más demandantes para el plegado como los anticuerpos simple cadena 2G3 y multimérico 14D9. La co-expresión de la forma activa del homólogo de XBP1, el bZIP60 Δ C, también produjo incrementos en los niveles de acumulación de las reporteras GUS y GFP pero fue menos efectiva que la obtenida con los genes del bZIP28 Δ C o Calnexina1.

La expresión de los genes de *Arabidopsis thaliana* bZIP60 Δ C y bZIP17 activó la respuesta a proteínas mal plegadas en *Nicotiana benthamiana* como se deduce de los incrementos en los niveles de acumulación de la chaperona de la familia HSP70, BiP. La activación de esta respuesta es un arma de doble filo, ya que aunque por un lado incrementa la expresión de genes de proteínas que asisten el plegado, por el otro, puede inhibir la traducción. La expresión del factor bZIP60 Δ C incrementó los niveles de las proteínas reporteras por lo que el primer efecto fue más importante.

A futuro, teniendo en cuenta que los factores de transcripción bZIP empleados actúan en distintos niveles de señalización y además pueden formar homo- y hetero-dímeros se espera poder evaluar si su combinación produce efectos aditivos o sinérgicos. Además, hay dos aspectos del funcionamiento de la vía secretoria en que estos reguladores podrían tener un resultado positivo. Por un lado, se ha propuesto que la formación de cuerpos proteicos en el retículo endoplasmático de hojas es consecuencia de los altos niveles de acumulación de la proteína foránea, por lo que se plantea evaluar si la co-expresión de estos factores reduce su formación. Por otro lado, hemos mostrado que cuando se expresan inmunoglobulinas vacuolares en hojas, una parte de las moléculas es transportada directamente desde el retículo endoplasmático a la vacuola sin pasar por el Golgi. La hipótesis es que la ruta de transporte directa podría deberse a saturación de la vía clásica que pasa por el Golgi o a limitaciones en el plegado. En ambas situaciones los reguladores estudiados en este trabajo podrían ejercer un efecto positivo.

MATERIALES Y MÉTODOS



1- Materiales

1.1- Material biológico

1.1.1- Cepas bacterianas

Escherichia coli:

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

JM110: *rpsL thr leu thi lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm glnV44 Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+)*. Utilizada en clonados que requieren el uso de enzimas de restricción sensibles a metilación.

PIR1: F- *Δlac169 rpoS(Am) robA1 creC510 hsdR514 endA recA1 uidA(ΔMlu)::pir-116*. Utilizada para amplificar vectores que tienen el origen de replicación R6Kγ, como el plásmido pUNI51.

TOP10 (OneShot® TOP10, Invitrogen Argentina, SA): F- *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-*. Utilizada en clonados que requieren alta eficiencia de transformación.

XL1-Blue: *endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)*. Utilizada en clonados convencionales.

Agrobacterium tumefaciens:

GV3101: porta el plásmido pMP90, que posee el gen de resistencia a gentamicina y lleva los genes necesarios para la transferencia del T-ADN.

1.1.2- Plantas

Nicotiana benthamiana jóvenes (4-5 semanas), crecidas en cuarto de cultivo a 22±2°C de temperatura y 60±10% de humedad con un fotoperiodo 16:8 hs. (luz:oscuridad). Sustrato Profesional GrowMix MultiPro (Turba de musgo Sphagnum de fibras medias, Compost de corteza, Cal calcita, Cal dolomita, Agentes humectantes). Se utilizó el fertilizante foliar Samppi N3 (importado por S. Ando y Cía. S.A., Argentina -origen: Japón) de composición N:P:K=8:3:3.

1.2- Medios y soluciones

1.2.1- Medios

Medio Luria-Bertani (LB): Triptona 10 g/L; Extracto de levadura 5g/L; NaCl 0,09 M. Para obtener medios de cultivo sólidos se adicionó 18 g/L de agar-agar.

Medio YEB: Triptona 10 g/L; Extracto de levadura 5g/L; Extracto de carne 5g/L; NaCl 0,09M; Glucosa 5,5.10-3M. Para obtener medios de cultivo sólidos se adicionó 18 g/L de agar-agar.

Medio S.O.C: Triptona 20g/L, Extracto de levadura 10g/l, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM, Glucosa 20mM.

Medio PSI: Triptona 20g/L, Extracto de levadura 5g/L, MgSO₄ 5 g/L, pH=7,60

1.2.2- Soluciones

Buffer fosfato salino (PBS): 10mM Na₃PO₄, 137 mM NaCl, 2,7mM KCl, pH=7,40.

Buffer TAE 50X: 2 M Tris, 50 mM EDTA, pH=8,00.

Buffer TFBI: 30mM Acetato de potasio, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂, 15 v/v Glicerol, pH=5,80

Buffer TFBII: 10mM MOPs, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl, 15 v/v Glicerol, pH=6,50

Buffer de Separación 4X: 1.5 M Tris-Cl, 0.4% SDS, pH=8,80.

Buffer de Stacking 4X: 0.5 M Tris-Cl, 0.4% SDS, pH=6,80.

Buffer de corrida 10X: 0,25 M Tris, 1,92 M glicina, 1% SDS, pH=8,30.

Buffer de transferencia 10X: 0,25 M Tris, 1,92 M glicina, pH=8,30 (al 1X se le adiciona 20% metanol).

Buffer de stripping: 62,5mM Tris-HCl, 2% SDS, 100mM B-mercaptoetanol.

Buffer de extracción para GUS: 7,8mM Na₂HPO₄; 12,2mM KH₂PO₄; 1mM EDTA; 0,5M NaCl, pH=7.

Buffer de extracción para GFP: 7,8mM Na₂HPO₄; 12,2mM KH₂PO₄; 1mM EDTA; 0,5M NaCl; pH=7,00.

Buffer de extracción para el anticuerpo ScFv-2G3: 0,2M Na₃PO₄, 0,5M NaCl, 10mM EDTA, pH=7,40

Buffer de extracción para el anticuerpo 14D9: 45mM Tris, 1,5M NaCl, 1mM EDTA, pH=7,40.

Buffer muestra 4X: 288mM Tris, 8% SDS, 40% Glicerol.

Acrilamida-Bis acrilamida 30,8% P/V: 30% acrilamida, 0.8% bisacrilamida.

Acetosiringona (4'-Hydroxy-3',5'-dimethoxyacetophenone) (Sigma-Aldrich, Catalog. #D134406) 500X: 100 mM en etanol.

1.3- Reactivos

Durante el desarrollo de este trabajo se usaron reactivos de grado analítico de:

Merck (Ex Sigma-Aldrich - Darmstadt, Alemania)

Sigma (St. Louis, Estados Unidos).

QIAGEN Inc. (Estados Unidos)

Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, Estados Unidos)

Las drogas y enzimas empleadas en los experimentos de Ingeniería genética fueron de grado Biología Molecular de:

MERCK (Ex Sigma-Aldrich - Darmstadt, Alemania)

Promega (Madison, Estados Unidos)

New England Biolabs, NEB (Ipswich, Massachusetts, Estados Unidos)

Thermo Fisher Scientific - Life technologies (Carlsbad, California, Estados Unidos)

PIERCE Biotechnology (Pierce Rockford, Illinois, Estados Unidos)

Transgene Biotech (Beijing, China)

1.4- Soluciones de antibióticos empleadas

Para la selección de bacterias las soluciones stock se prepararon con agua estéril a una concentración 1000 veces superior a la de trabajo (1000x). Las concentraciones de las soluciones stock fueron de 50mg/ml para Kanamicina (Sigma Aldrich, Catalog. # K4378), Gentamicina (Sigma Aldrich, Catalog. # G6896) y Ampicilina (Sigma Aldrich, Catalog #A0166-5G).

1.5- Vectores plasmídicos utilizados.

1.5.1- Plásmidos adquiridos comercialmente:

Vectores de clonado: Se utilizó el plásmido pCR[®]2.1-TOPO (Life Technologies Invitrogen, Catalog # K4500-01) que permiten el clonado de productos de PCR amplificados con Taq Polimerasa por medio de la reacción TOPO.

Plásmidos comprados al Arabidopsis Stock Center:

pENTR-SD-D-TOPO-CNX1 (U16625)

pENTR221-PEI1 (DQ446927)

pUNI51-CRT1B (U12986)

Secuencias sintéticas:

Se diseñó una secuencia sintética (SecS) que tuviera la secuencia de reconocimiento para las enzimas de restricción *KpnI* en el extremo 5' y *XhoI* en el extremo 3', los sitios attL para la recombinación homóloga por el sistema Gateway, una secuencia de relleno denominada ZZ y la secuencia de reconocimiento para la enzima *SfiI* flanqueando a ZZ (Anexo III). El proveedor entrega la secuencia incorporada en el sitio de clonado múltiple del plásmido pUC57.

El llamado plásmido sintético pUC57-ZZ (Anexo III), es también producto del diseño de una secuencia sintética que fue incorporada al plásmido pUC57 por el proveedor. Esta secuencia contiene los sitios attL para recombinación homóloga por el sistema Gateway flanqueando a: (de 5' a 3') la secuencia codificante para un péptido señal secretorio proveniente de inmunoglobulina G de ratón que funciona correctamente en plantas [205], la secuencia de relleno ZZ utilizada anteriormente, y las secuencias codificantes para la señal KDEL de retención en el retículo endoplásmico [82] y un tag de 6 residuos de histidinas.

1.5.2- Plásmidos construidos en nuestro laboratorio:

El vector pMonAmh, que posee resistencia a ampicilina, fue utilizado para la construcción del marcador de peso molecular mediante la digestión con *HindIII* (Invitrogen Argentina, SA).

pENTR/D-TOPO-bZIP60ΔC

pENTR/D-TOPO-bZIP17

pENTR/D-TOPO-bZIP28ΔC

pEarley104- bZIP60ΔC

pGWB41-bZIP17

pBIN61-p19

pBIN61-RE-GFP

pBIN61-RE-GUS

pGWB2-RE-RFP-2G3

pGA482-RE-HC14D9

pGA482-LC14D9

1.5.3- Plásmidos cedidos por otros laboratorios:
pEAQ-HT-DEST1. Sainsbury y col. (2009) [78]

1.6- Cebadores utilizados.

Los cebadores específicos utilizados figuran en el Anexo III y han sido diseñados para el clonado del cDNA codificante de la Calreticulina1B desde el vector pUNI51 al vector binario pEAQ-HT-DEST1.

1.7 Enzimas y *kits* enzimáticos

Enzimas de restricción: *Kpn1*, *HindIII*, *Mlu1*, *Sfi1*, *Xho1*, *Nco1* y *PflMI3* adquiridas comercialmente junto con sus correspondientes buffers de reacción, a los proveedores siguientes, según se indica:

1 Promega (Madison, Estados Unidos); 2 Invitrogen (California, Estados Unidos); 3 New England BioLabs (Massachusetts, Estados Unidos).

Otras enzimas:

-*Taq* DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific - Fermentas).

-Ligasa de fago T4 (T4 Ligase; Promega Corp., Madison, EE.UU.).

-LR Clonase® Mix (Life Technologies-Invitrogen, California, Estados Unidos) utilizado para catalizar la reacción de recombinación homóloga Gateway, provista junto con la enzima Proteinasa K para dar punto final a dicha reacción.

1.8- Anticuerpos

Para la detección de GFP se utilizó un anticuerpo primario comercial anti-GFP de ratón (Sigma-Aldrich, product # G1546) diluído 1:1000 en leche 1%p/v en *buffer* PBS.

La proteína BiP, fue detectada con un anticuerpo policlonal anti-BiP de conejo diluído 1:4000 en leche 1%p/v en *buffer* PBS.

La detección del anticuerpo simple cadena 2G3 fusionado al tag de histidina, fue detectado utilizando un anticuerpo anti-His de ratón (GE Healthcare, coding #27-4710-01) diluído 1:1000 en leche 1%p/v en *buffer* PBS y su fusión a RFP fue detectada con el anticuerpo anti-RFP de conejo (Thermo Scientific Pierce, product # R10367) diluído 1:1000 en leche 1%p/v en *buffer* PBS.

El anticuerpo 14D9 fue detectado con un anticuerpo anti-ratón IgG (H+L) de cabra conjugado con biotina (Thermo Scientific Pierce, product # 31802) diluído 1:3000 en leche 1%p/v en *buffer* PBS.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-ratón IgG (H+L) de cabra conjugado con biotina (Thermo Scientific Pierce, product # 31802) diluído 1:20000 en leche 1%p/v en *buffer* PBS y anti-conejo IgG (H+L) de cabra conjugado con biotina (Thermo Scientific Pierce, product # 31820) diluído 1:1000 en leche 1%p/v en *buffer* PBS.

Para la detección del anticuerpo secundario se utilizó estreptavidina conjugada con HRP (Thermo Scientific Pierce product # 21130) diluída 1:20000 en leche 1%p/v en *buffer* PBS.

1.9- Herramientas informáticas utilizadas.

Base de datos de TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>): utilizada para la obtención de las secuencias nucleotídicas codificantes y aminoácidas de los efectores utilizados en este trabajo.

Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>): utilizado para el análisis *in silico* de los niveles de expresión de genes durante el desarrollo de semillas de *A. thaliana*.

Expasy, SIB Bioinformatics Resource Portal (<https://web.expasy.org/translate/>): utilizada para la traducción in-silico de secuencias nucleotídicas.

TMHMM Server v. 2.0 de DTU Bioinformatics (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>): utilizado para la predicción de dominios transmembrana y la orientación del producto proteico.

Plant Transcription Factor Database v4.0 (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>): utilizado para el análisis *in silico* de las secuencias de aminoácidos de los efectores.

UNIProt (www.uniprot.org/): utilizado para el análisis *in silico* de las secuencias de aminoácidos de los efectores.

Primer BLAST (NCBI-NIH, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome): utilizada para el diseño y análisis de cebadores de amplificación.

Clone Manager 9 Professional Edition: utilizado para simular reacciones de PCR que permitieron verificar la continuidad de los marcos de lectura de las construcciones durante la adición de sitios de restricción, y el clonado de las construcciones obtenidas en los vectores de clonación y expresión. Estos vectores fueron virtualmente digeridos con enzimas de restricción y de esta manera se establecieron los patrones de peso molecular esperados.

ImageJ: utilizado para la cuantificación de bandas de los inmunoensayos y de geles teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 por densitometría.

InfoStat (versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>): utilizado para el análisis estadístico.

GraphPad Prism 5: utilizado para el armado de las figuras y el análisis estadístico.

2- Métodos

2.1- Minipreparación de ADN plasmídico

La purificación de ADN plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina utilizando el kit comercial EasyPure Plasmid MiniPrep Kit #EM101-02 (Transgen Biotech), según el protocolo recomendado por el fabricante.

2.2- Reacciones de PCR:

2.2.1- Reacciones de PCR a partir de ADN desnudo:

Las reacciones de PCR se realizaron con la ADN polimerasa termoestable Taq (Fermentas #EP0401) en un volumen final de 15 μ l. La composición de las mezclas de reacción para cada una de ellas se presenta en la tabla 10.

Para la puesta a punto del ciclo de PCR, se realizaron reacciones en gradiente de temperatura, donde el único parámetro variable fue la temperatura de hibridación de los cebadores. La temperatura de hibridación elegida fue de 58°C. Se utilizó el programa de amplificación detallado en la Tabla 11. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un ciclador térmico Gradient MyCycler™ (Bio-Rad).

Tabla 10. Mezclas de PCR utilizadas

Componente	Concentración final
Buffer Taq (10X)	1X
MgCl ₂ 25mM	2mM
dNTPs 10mM	0,4mM
Primer directo	0,5 μ M
Primer reverso	0,5 μ M
Taq Polimerasa	2-5U

Tabla 11. Programa de amplificación utilizado en las reacciones de PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
i) Desnaturalización inicial	94	4
ii) Desnaturalización	94	0,5
iii) Hibridación	58	0,5
iv) Amplificación	72	1,3
v) Amplificación final	72	10

Las etapas II, III y IV se repiten en ese orden por 30 ciclos.

2.2.2- Reacciones de PCR a partir de colonias:

Se utilizó este método para realizar un rápido *screening* de los clones obtenidos. Se preparó una premezcla de PCR (todos los componentes excepto el molde de ADN) que contemple el volumen necesario para las colonias que se deseen evaluar y los controles apropiados. Se procedió a alicuotar la pre-mezcla en los tubos de PCR (se trabaja en hielo), y a continuación con una punta de micropipeta se tomó una fracción de una de las colonias a analizar y se introdujo en el tubo de PCR a modo de molde de ADN. Inmediatamente después se utilizó el mismo *tip* para sembrar una placa de medio LB con el antibiótico de selección. Los tubos se colocan en el termociclador y se procedió con la reacción de la misma forma que realizaron otras reacciones de PCR.

2.3- Electroforesis de ADN en geles de agarosa:

Las muestras de ADN, tanto plasmídico como productos de digestión enzimática y fragmentos de amplificación de PCR, fueron analizadas en geles de agarosa 0,8% p/v. La agarosa se disolvió en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), y luego se adicionó bromuro de etidio (BrEt) que permitió la visualización de las bandas en la luz ultravioleta. Las muestras se mezclaron con 1/4 volumen de buffer 4X de siembra para ADN (buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0, glicerol 50 % p/v, azul de bromofenol 1 % p/v, EDTA 2 mM pH 8,0) previo al sembrado de las mismas. Las electroforesis fueron llevadas a cabo en buffer TAE 1X a voltaje constante (90V). Para visualizar las corridas electroforéticas se utilizó un transiluminador de UV (UVP).

2.4- Purificación de ADN a partir de gel de agarosa utilizando un kit comercial:

La purificación de los fragmentos de ADN provenientes de digestiones enzimáticas y productos de amplificación de PCR, se llevó a cabo con el kit de purificación HiYield™Gel/PCR Fragments Extraction Kit YDF 100 (BioAmerica Inc) según el protocolo recomendado por el fabricante.

Se cortaron las bandas del gel de agarosa que contienen los fragmentos de ADN de interés y se colocaron en un tubo de 1,5 ml. Posteriormente se adicionó 0,5 ml de buffer de dilución (DF buffer) y se incubaron a 55°C durante 10 minutos. Luego se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Las muestras se transfirieron a las columnas de purificación (DF Column) provistas por el fabricante, donde fueron sometidas a varios pasos de lavado. Finalmente el ADN se eluyó de la columna con agua bidestilada estéril, recuperándolo en un tubo de 1,5 ml estéril. Las muestras de ADN purificadas fueron almacenadas a -20°C.

2.5- Digestiones enzimáticas:

Las enzimas de restricción utilizadas, solas o combinadas, fueron: *HindIII*, *MluI*, *SfiI*, *NcoI*, *KpnI* y *PfI*. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20µl, utilizando 10 U de cada enzima en el buffer correspondiente según recomendación del fabricante y 5µl de la preparación de plásmido. Las mezclas de reacción fueron incubadas de 1 a 3 horas según el caso, a 50°C para *SfiI* y 37°C para las demás enzimas.

2.6- Ligaciones de ADN:

Las reacciones de ligación de moléculas de ADN se llevaron a cabo con la enzima T4 ADN Ligasa (Promega) en un volumen final de 15µl, utilizando 1U Weiss de enzima, 1µl del vector y 5-8µl del inserto en el buffer correspondiente según recomendación del fabricante. Las mezclas de reacción fueron incubadas toda la noche a 25°C.

2.7- Reacción de clonado TOPO® TA:

Las reacciones de clonado TOPO® TA permiten el clonado directo de productos de PCR amplificados por la Taq Polimerasa, aprovechando la adición de una adenina al extremo 3' de esta enzima. Para estas reacciones se utilizó el plásmido pCR®2.1-TOPO (Life Technologies Invitrogen, Catalog # K4500-01). Para cada reacción se preparó una mezcla que incluyó 4µl del amplicón, 1µl del vector TOPO® y 1µl de la solución de sales provista por el fabricante. Las mezclas de reacción fueron incubadas toda la noche a 25°C.

2.8- Recombinación sitio específica mediante el sistema Gateway (LR clonasa):

La recombinación sitio específica se realizó entre el inserto de interés contenido en el vector de entrada (pENTR/D-TOPO; pENTR-SD-D-TOPO o pENTR221) y el vector binario pEAQ-HT-DEST1. Para aumentar la eficiencia de la reacción, se realizó una digestión previa del vector de entrada con *MluI* y se purificó el fragmento de ADN que contenía el inserto.

Se preparó la mezcla de reacción, la cual consistió en 8µl del inserto, 0,5µl del vector binario y 0,5µl de la enzima LR clonasa. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Luego se adicionaron 0,5µl de proteinasa K para producir la inactivación de la enzima incubando 10 min a 37 °C. Con la mezcla obtenida se transformaron 50µl de células competentes químicas *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Las transformantes fueron seleccionadas mediante incubación en medio de cultivo agar LB con Kanamicina, este antibiótico corresponde a la resistencia codificada en el vector binarios pEAQ-HT-DEST1.

2.9- Preparación de células competentes:

2.9.1- Células de *E. coli* competentes químicas:

Las células de *E. coli* competentes químicas se prepararon por el método de cloruro de rubidio. Se partió de un stock de células conservado en glicerol a -80°C , se realizó un cultivo en medio LB con el antibiótico correspondiente y se dejó crecer toda la noche en agitación (200rpm) a 37°C . Al día siguiente se tomó una alícuota de dicho cultivo para inocular un volumen de 500ml de medio PSI con el antibiótico correspondiente. Se incubó este cultivo en agitación a 37°C hasta alcanzar una DO_{600} de aproximadamente 0,5. Se incubó el cultivo 15 minutos a 4°C y luego se centrifugó 5 minutos a 5000rpm a 4°C (Ultracentrífuga Beckman Coulter Avanti J-25). Luego el precipitado se resuspendió en 200ml de buffer TBF1. Se repitió la incubación a 4°C y la centrifugación. Se resuspendió el precipitado en 20ml de buffer TBFII e incubó 15 minutos a 4°C . Finalmente se fraccionó de a $100\mu\text{l}$ en tubos estériles y congeló en nitrógeno líquido para luego almacenar a -80°C .

2.9.2- Células de *E. coli* o *A. tumefaciens* electrocompetentes:

Para la preparación de células electrocompetentes se partió de un stock de células conservado en glicerol a -80°C , se realizó un cultivo en medio LB con el antibiótico correspondiente y se dejó crecer toda la noche en agitación (200rpm) a 37°C para *E. coli* o 28°C para *A. tumefaciens*. Al día siguiente se tomó una alícuota de dicho cultivo para inocular un volumen de 500ml de medio LB sin cloruro de sodio con el antibiótico correspondiente. Se incubó este cultivo en agitación a 37°C para *E. coli* o 28°C para *A. tumefaciens* hasta alcanzar una DO_{600} de aproximadamente 0,5. Luego se centrifugó el cultivo 5 minutos a 5.000rpm a 4°C (Ultracentrífuga Beckman Coulter Avanti J-25) y resuspendió el precipitado en 50ml de glicerol al 10% estéril. Se centrifugó 5 minutos a 10.000rpm a 4°C y resuspendió el precipitado en 25ml de glicerol al 10% estéril. Se repitió la centrifugación y el precipitado se resuspendió en 5ml de glicerol al 10% estéril. Finalmente se fraccionó de a $100\mu\text{l}$ en tubos estériles y congeló en nitrógeno líquido para luego almacenar a -80°C .

2.10- Transformación química de células competentes de *E.coli*:

Se partió de un stock de células competentes conservado a -80°C , el cual fue retirado 10 minutos antes de llevar a cabo la transformación y se colocó inmediatamente en hielo, donde las células se descongelaron. A continuación se adicionó la cantidad adecuada de plásmido según el caso, y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, se realizó un shock térmico colocando la preparación en un bloque térmico a 42°C , durante 30 segundos e inmediatamente se volvió a colocar en hielo durante 2 minutos. Se adicionó 1ml de medio de cultivo S.O.C. (precalentado a 37°C) y se incubó 1h a 37°C con una agitación de 200 rpm en agitador orbital (LabLine). Pasado este tiempo, el cultivo se concentró y se sembró en mechero o flujo laminar, con varilla de vidrio, en placas con agar LB con el antibiótico de selección. En el caso de la transformación con plásmidos recombinantes que permiten la identificación por color (selección blanco/azul), el medio de cultivo se suplementó con $30\mu\text{l}$ de una solución 10 mg/ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) y $2\mu\text{l}$ de 1M IPTG (isopropiltio- β -galactósido). Como control se llevó a cabo el mismo procedimiento sin adicionar plásmido a las células, la aparición de colonias hubiera indicado algún tipo de contaminación o problemas con la selección.

2.11- Transformación eléctrica de células competentes de *E.coli* y *Agrobacterium tumefaciens* GV3101:

Se partió de un stock de células electrocompetentes conservado a -80°C . Tanto las células como las cubetas estériles de 2mm (Bio-Rad) se colocaron en hielo 10 minutos antes de realizar la transformación. Una vez descongeladas, se pusieron en contacto $100\mu\text{l}$ de células con $0,5-5\mu\text{l}$ de la preparación de plásmido necesariamente libre de electrolitos. Se colocó la mezcla inmediatamente en la cubeta y se incubó 1 minuto en hielo. A continuación, se colocó la cubeta en el electroporador (Bio-Rad Gene Pulser II) y se procedió a electroporar bajo las siguientes condiciones:

Capacitancia: $25\mu\text{F}$

Voltaje: 2.5 KV

Resistencia: 200Ω

Inmediatamente después de la electroporación, se adicionó a la cubeta 1ml de medio S.O.C. (pre-calentado a 37°C). La mezcla se transfirió a un tubo estéril y se incubó en agitación (200 rpm) 1 hora a 37°C en el caso de *E. coli* o toda la noche a 28°C para *A.tumefaciens*. Posteriormente, el cultivo se concentró por centrifugación y se sembró en esterilidad con varilla de vidrio, en placas LB con el antibiótico de selección adecuado. Como control se llevó a cabo el mismo procedimiento,

omitiendo la adición de plásmido a las células. La aparición de colonias hubiera indicado algún tipo de contaminación o selección deficiente.

2.12- Crecimiento de las plantas *N. benthamiana*:

Para el crecimiento de las plantas *Nicotiana benthamiana* utilizadas en los ensayos de expresión transitoria, se utilizaron cuartos de cultivo, aislados de la luz solar a temperatura y humedad controlada. La temperatura utilizada fue $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ controlada con un aire acondicionado split frío-calor. La humedad relativa utilizada $60\pm 10\%$, controlado por un higrómetro (Cavadevices, Argentina con sensor de humedad relativa Honeywell, USA) conectado a pulverizador de alta presión PC-2801B (Taizhou Paichi Machinery Co., Ltd, China. Los ciclos de luz:oscuridad se fijaron en 16:8hrs., en donde las fuentes de iluminación estaban controladas por un *timer* para su encendido y apagado.

Las semillas de *Nicotiana benthamiana* fueron germinadas y crecidas inicialmente en las mismas condiciones y a la semana fueron transplantadas y colocadas en macetas de 9cm de diámetro. A partir de este momento las plantas fueron crecidas en las distintas condiciones de luz:

I) tubos fluorescentes blanco frío 36W,

II) chip LED *Full Spectrum* (10W)

III) combinación de chips LED rojos 10W (625-660nm) y azules 10W (450-465nm) en relación

2:1.

Se instalaron 5 tubos fluorescentes por estante que se dispusieron paralelamente a lo ancho del mismo. En el caso de las luces LED tanto *Full Spectrum* como Rojo-Azul se dispusieron 9 luces en el centro del estante sobre un listón de aluminio que funcionaba como disipador.

Se empleó sustrato Profesional GrowMix MultiPro (Turba de musgo Sphagnum de fibras medias, Compost de corteza, Cal calcita, Cal dolomita, Agentes humectantes) y se utilizó el fertilizante foliar Samppi N3 (importado por S. Ando y Cía. S.A., Argentina -origen: Japón) de composición N:P:K=8:3:3.

2.13- Determinación del contenido relativo de agua (CRA):

Para la determinación del CRA, se utilizaron hojas de plantas *Nicotiana benthamiana* crecidas durante 4 semanas bajo las distintas fuentes de luz. Estas hojas se pesaron por triplicado en balanza analítica, siendo este el peso fresco (PF) de cada hoja y luego se dispusieron dentro de tubos de ensayo con agua de manera que sólo el extremo del pecíolo esté en contacto con el líquido. Se incubaron en oscuridad, a 4°C durante 24 horas y luego se secó el agua de la superficie y se pesaron nuevamente por triplicado, siendo este el peso en estado de turgencia máxima (PT). Finalmente, estas hojas se secaron en estufa a 70°C por 24 horas, momento en que se pesaron nuevamente por triplicado para registrar el peso seco (PS). El contenido relativo de agua se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CRA (\%)} = \frac{(\text{PF} - \text{PS})}{(\text{PT} - \text{PS})} \times 100$$

2.14- Agroinfiltración de plantas *N. benthamiana*:

Los ensayos de agroinfiltración se efectuaron de acuerdo al método descrito por Batoko y col., (2000) [206]. 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). Luego se indujo el cultivo por el agregado de acetosiringona (concentración final 200 mM) y se lo incubó a 28°C durante 2-4 hs. El cultivo se diluyó hasta obtener la DO_{600} deseada para cada construcción según la tabla 12. Se prepararon las suspensiones bacterianas correspondientes por medio de centrifugación y resuspensión de las bacterias en agua destilada. A continuación se infiltró la superficie abaxial de las hojas de *N. benthamiana* de 4 semanas de edad utilizando una jeringa de 1 ml sin aguja. Las plantas infiltradas se mantuvieron en las mismas condiciones utilizadas para su crecimiento.

Tabla 12. Concentración de bacterias utilizada para la agroinfiltración de las distintas construcciones utilizadas.

Construcción génica	DO ₆₀₀ utilizada
bZIP60ΔC	0,2
bZIP17	0,2
bZIP28ΔC	0,5
CNX1	0,5
p19	0,1
RE-GFP	0,1
RE-GUS	0,4
RE-RFP-2G3	0,2
RE-HC14D9	0,6
LC14D9	0,6

2.15- Extracción de proteínas en hojas de plantas:

La toma de muestra se realizó colectando 6 discos de hojas de 3 a 5 plantas diferentes agroinfiltradas con la construcción de interés, pesando la cantidad de muestra recolectada en balanza analítica. Se procedió a moler las muestras con un pilón adecuado, utilizando un tubo de 1,5ml como mortero, manteniéndolas siempre en hielo. A continuación se adicionó PVPP (polivinil polipirrolidona) y un volumen de buffer de extracción igual al peso de la muestra. En caso de que la extracción se realice directamente en buffer muestra, las mismas se incubaron a 95 °C durante 5 minutos, para desnaturalizar proteasas y evitar que se degrade la proteína de interés. Luego las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 4°C a 15.000rpm y el sobrenadante fue recolectado en un tubo de 1,5ml para el desarrollo de ensayos posteriores o para su almacenamiento a -80°C.

2.16- Cuantificación de proteínas:

Para los extractos realizados con buffer de extracción en condiciones no desnaturizantes se cuantificó la cantidad de proteínas solubles totales por el método del ácido bicinonínico (BCA) [207]. Para estas determinaciones se utilizó un kit comercial (Pierce™ BCA Protein Assay Kit #23225). Las medidas se realizaron utilizando un espectrofotómetro Beckman DU650 UV/Visible, a una longitud de onda de 562nm y corrigiendo las medidas por el camino óptico. Se utilizó albúmina de suero bovino como estándar para realizar la curva de calibración.

2.17- Determinación de actividad de la enzima β-glucuronidasa:

Para determinar la actividad de la enzima β-glucuronidasa en los extractos de hojas de *N. benthamiana* transformadas, se utilizó el método de fluorescencia, utilizando 4-metilumbelliferil-beta-D-glucuronido -MUG- (Santa Cruz Biotech, sc-280452) como sustrato. Se mezclaron 500μl de una solución 1mM de MUG en buffer de extracción para GUS con 1mg de proteínas solubles totales provenientes de los extractos cuya concentración de proteínas fue previamente cuantificada. Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un lector de placas Synergy HT, BioTek, utilizando una placa negra de 96 pocillos (Greiner Bio-One International, #655076), a 37°C, estableciendo una longitud de onda de excitación de 360/40nm y una longitud de onda de emisión de 460/40. Se tomaron medidas cada 5 minutos durante una hora, para luego calcular la medida de actividad enzimática a partir de la pendiente de la curva Fluorescencia vs. tiempo.

2.18- Determinación de niveles de fluorescencia verde:

Los niveles de fluorescencia verde de los extractos de hoja de *N. benthamiana* fueron medidos en un lector de placas Synergy HT, BioTek, y utilizando una placa negra de 96 pocillos (Greiner Bio-One International, #655076). Según la optimización de las condiciones de medida detallada en el Anexo I, las determinaciones se realizaron a una longitud de onda de excitación de $\lambda_{ex}=485\pm 20$ nm y una longitud de onda de emisión de $\lambda_{em}=528\pm 20$ nm. Se colocaron 100μl de muestra por pocillo para realizar las determinaciones y los valores de fluorescencia fueron corregidos por la concentración de los extractos.

2.19- Determinación de niveles de fluorescencia roja:

Los niveles de fluorescencia roja de los extractos de hoja de *N. benthamiana* fueron medidos en un lector de placas TECAN, Infinite® 200 PRO y utilizando una placa negra de 96 pocillos (Greiner Bio-One International, #655076). Se establecieron una longitud de onda de excitación de 543nm y una longitud de onda de emisión de 611nm. Se colocaron 100μl de muestra por pocillo para

realizar las determinaciones y los valores de fluorescencia fueron corregidos por la concentración de los extractos.

2.20- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, (SDS-PAGE):

Las electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDSPAGE) se efectuaron utilizando el equipo Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la preparación de los geles de poliacrilamida se siguió el siguiente protocolo: Se preparó el gel de separación según la composición indicada en la tabla 13, se agregó el TEMED y el persulfato de amonio, se mezcló suavemente para evitar la incorporación de aire y se colocó entre los vidrios con la ayuda de una pipeta automática. Una vez cargado $\frac{3}{4}$ de volumen total se agregó un volumen pequeño de etanol 70% v/v para evitar que el oxígeno del aire inhiba la polimerización de la superficie. Se esperaron aproximadamente 30 minutos para dar lugar a la polimerización y luego se preparó el gel de apilamiento de la misma manera.

Tabla 13: Composición de los geles de poliacrilamida.

Componente	Gel de apilamiento*	Gel de separación*		
		10%	12,5%	15%
Buffer 4X	1,25	2,50	2,50	2,50
Agua bidestilada	3,00	4,30	3,40	2,50
Acrilamida-Bis 30,8%	0,80	3,20	4,10	5,00
Persulfato	0,04	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01

*Los volúmenes están expresados en ml.

Para realizar la corrida electroforética, las muestras se mezclaron con buffer muestra y β -mercaptoetanol al 5% y se incubaron 5 minutos a 95°C. Las electroforesis se corrieron a 15mA hasta pasar el gel de apilamiento, momento en que la corriente se subió a 25mA por gel.

2.21- Inmunoensayo:

Transferencia: Luego de efectuada la electroforesis, los geles de poliacrilamida fueron equilibrados por 5 min en *buffer* de transferencia junto con la membrana de nitrocelulosa y los papeles de filtro (Schleicher & Schuell Bioscience, Keene, NH). Se montó el *cassette* del equipo de electrotransferencia Fastblot B44 (Biometra) colocando el gel y la membrana de nitrocelulosa entre los papeles de filtro, asegurando que no queden burbujas de aire entre las capas. Se montó el equipo y se aplicó una corriente de 5mA por cm² durante 45 minutos.

Confirmación de la transferencia: Luego de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con una solución de colorante Rojo Ponceau (Sigma-Aldrich - 0,5%p/v de colorante RP en ácido acético 1% v/v) por 5 minutos, luego se lavaron con H₂O bidestilada estéril hasta decolorar el fondo.

Revelado: Las membranas se bloquearon incubándolas 1 hora a 37°C en leche descremada en polvo 5%p/v en PBS. Luego se lavaron 6 veces durante 5 minutos con el *buffer* PBS. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario elegido durante toda la noche a 4 °C. A continuación se lavó la membrana de la misma manera que antes y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora a 37°. Luego se procedió nuevamente a lavar la membrana con PBS. Finalmente se incubó la membrana con estreptavidina conjugada con peroxidasa (HRP) durante 30 minutos a 37°C, para luego lavar nuevamente la membrana de la misma manera que los pasos previos. La señal inmunoreactiva fue detectada con placas fotográficas (Amersham HyperfilmTM MP, GE Healthcare) utilizando como sustrato la mezcla de solución A (luminol 4%p/v en DMSO, ácido p-cumárico 1,5%p/v en DMSO, en buffer separador diluido 1:10) con igual volumen de solución B (H₂O₂ 100 vol en buffer separador diluido 1:10).

2.22- Stripping:

Para reutilizar las membranas de nitrocelulosa, y así poder revelarlas con otro anticuerpo de interés, se procedió a eliminar los anticuerpos unidos mediante una incubación en *buffer* de stripping a 60°C durante 30 minutos. Luego se lavó 6 veces con PBS durante 5 minutos. A continuación, se bloqueó la membrana nuevamente con leche descremada en polvo 5% p/v en PBS y se desarrolló el inmunoblot normalmente.

3- Análisis estadístico:

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con los programas GraphPad Prism (version 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) e InfoStat (versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>). Para evaluar los datos estadísticamente se llevó a cabo un test one-way ANOVA. Las muestras se compararon estadísticamente aplicando los test de Dunnet oTukey según el caso. Alternativamente se utilizó un t-test de student.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- [1] J. K. C. Ma, P. M. W. Drake, and P. Christou, "The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 4, no. 10, pp. 794-805, 2003.
- [2] N. Baeshen *et al.*, "Cell factories for insulin production," *Microb. Cell Fact.*, vol. 13, p. 141, 2014.
- [3] J. Nielsen, "Production of biopharmaceutical proteins by yeast," *Bioengineered*, vol. 4, no. 4, pp. 207-211, 2013.
- [4] A. L. Demain and P. Vaishnav, "Production of Recombinant Proteins by Microbes and Higher Organisms," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, pp. 297-306, 2009.
- [5] P. Vermij and E. Waltz, "USDA approves the first plant-based vaccine," *Nat. Biotechnol.*, vol. 24, no. 3, pp. 233-234, 2006.
- [6] C. M. Hernandez-Garcia and J. J. Finer, "Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements," *Plant Sci.*, vol. 217-218, pp. 109-119, 2014.
- [7] G. P. Lomonosoff and M. A. D'Aoust, "Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment," *Science (80-.)*, vol. 353, no. 6305, pp. 1237-1240, 2016.
- [8] E. Stoger, J. K. C. Ma, R. Fischer, and P. Christou, "Sowing the seeds of success: Pharmaceutical proteins from plants," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 16, no. 2, pp. 167-173, 2005.
- [9] R. M. Twyman, S. Schillberg, and R. Fischer, "Transgenic plants in the biopharmaceutical market," *Expert Opin.*, vol. 10, no. 1, pp. 185-218, 2005.
- [10] J. A. Howard and E. E. Hood, *Commercial Plant-Produced Recombinant Protein Products: Case Studies*, vol. 68, 2014.
- [11] G. P. Pogue *et al.*, "Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 8, no. 5, pp. 638-654, 2010.
- [12] M. Bendandi *et al.*, "Rapid, high-yield production in plants of individualized idiotype vaccines for non-Hodgkin's lymphoma," *Ann. Oncol.*, vol. 21, no. 12, pp. 2420-2427, 2010.
- [13] N. Takeyama, H. Kiyono, and Y. Yuki, "Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials," *Ther. Adv. Vaccines*, vol. 3, no. 5-6, pp. 139-154, 2015.
- [14] J. L. Fox, "First plant-made biologic approved," *Nat. Biotechnol.*, vol. 30, no. 6, pp. 472-472, 2012.
- [15] Y. Tekoah *et al.*, "Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture – the protalix experience," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 13, no. 8, pp. 1199-1208, 2015.
- [16] R. Reski, J. Parsons, and E. L. Decker, "Moss-made pharmaceuticals: From bench to bedside," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 13, no. 8, pp. 1191-1198, 2015.
- [17] S. H. Bhoo, H. Lai, J. Ma, C. Arntzen, Q. Chen, and H. Mason, "Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 9, no. 7, pp. 807-816, 2014.
- [18] N. Landry *et al.*, "Preclinical and Clinical Development of Plant-Made Virus-Like Particle Vaccine against Avian H5N1 Influenza," *PLoS One*, vol. 5, no. 12, p. e15559, Dec. 2010.
- [19] V. Andrianov *et al.*, "Production of recombinant anthrax toxin receptor (ATR/CMG2) fused with human Fc in planta," *Protein Expr. Purif.*, vol. 70, no. 2, pp. 158-162, 2010.
- [20] J. K. C. Ma *et al.*, "Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 13, no. 8, pp. 1106-1120, 2015.
- [21] M. Oszvald *et al.*, "Expression of cholera toxin B subunit in transgenic rice endosperm," *Mol. Biotechnol.*, vol. 40, no. 3, pp. 261-268, 2008.
- [22] S. Kang *et al.*, "Expression of the Human Tissue-Plasminogen Activator in Hairy Roots of Oriental Melon (*Cucumis melo*)," *Plant Mol. Biol. Report.*, vol. 29, no. 4, pp. 919-926, 2011.
- [23] A. Castilho and H. Steinkellner, "Glyco-engineering in plants to produce human-like N-glycan structures," *Biotechnol. J.*, vol. 7, no. 9, pp. 1088-1098, 2012.
- [24] H. Stein *et al.*, "Production of bioactive, post-translationally modified, heterotrimeric, human recombinant type-I collagen in transgenic tobacco," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 9, pp. 2640-2645, 2009.
- [25] O. Shoseyov, Y. Posen, and F. Grynspan, "Human Recombinant Type I Collagen Produced in Plants," *Tissue Eng. Part A*, vol. 19, no. 13-14, pp. 1527-1533, 2013.
- [26] O. Shoseyov, Y. Posen, and F. Grynspan, "Human collagen produced in plants: More than just another molecule," *Bioengineered*, vol. 5, no. 1, pp. 49-52, 2014.
- [27] E. E. Hood *et al.*, "Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification," *Mol. Breed.*, vol. 3, pp. 291-306, 1997.
- [28] A. Magnusdottir, H. Vidarsson, J. M. Björnsson, and B. L. Örvar, "Barley grains for the production of endotoxin-free growth factors," *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 10, pp. 572-580, 2013.
- [29] M. Tschofen, D. Knopp, E. Hood, and E. Stöger, "Plant Molecular Farming: Much More than Medicines," *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 9, no. 1, pp. 271-294, 2016.
- [30] R. Fischer, E. Stoger, S. Schillberg, P. Christou, and R. M. Twyman, "Plant-based production of biopharmaceuticals," *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 7, no. 2, pp. 152-158, 2004.
- [31] E. Stoger, R. Fischer, M. Moloney, and J. K.-C. Ma, "Plant Molecular Farming for the Treatment of Chronic and Infectious Diseases," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 65, no. 1, pp. 743-768, 2014.
- [32] R. M. Twyman, E. Stoger, S. Schillberg, P. Christou, and R. Fischer, "Molecular farming in plants: Host systems and expression technology," *Trends Biotechnol.*, vol. 21, no. 12, pp. 570-578, 2003.
- [33] N. Fujiuchi, N. Matoba, and R. Matsuda, "Environment Control to Improve Recombinant Protein Yields in Plants Based on *Agrobacterium*-Mediated Transient Gene Expression," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 4, no. 23, pp. 1-6, 2016.
- [34] M. J. Iqbal, P. H. Goodwin, E. D. Leonardos, and B. Grodzinski, "Spatial and temporal changes in chlorophyll fluorescence images of *Nicotiana benthamiana* leaves following inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*," *Plant Pathol.*, vol. 61, no. 6, pp. 1052-1062, 2012.
- [35] J. H. Norikane, M. Biotechnology, and I. Way, "The Potential of LEDs in Plant-based Bio-pharmaceutical Production," vol. 50, no. 9, pp. 1289-1292, 2015.
- [36] M. G. Annunziata *et al.*, "Getting back to nature: a reality check for experiments in controlled environments," vol. 68, no. 16, pp. 4463-4477, 2017.
- [37] T. Ouzounis, E. Rosenqvist, and C.-O. Ottosen, "Spectral Effects of Artificial Light on Plant Physiology and Secondary Metabolism: A Review," *HortScience*, vol. 50, no. 8, pp. 1128-1135, 2015.
- [38] M. W. van Iersel, "Optimizing LED Lighting in Controlled Environment Agriculture," in *Light Emitting Diodes for Agriculture*, Singapore: Springer Singapore, 2017, pp. 59-80.
- [39] Q. Liu and Q. Xue, "Comparative studies on codon usage pattern of chloroplasts and their host nuclear genes in four plant species," *J. Genet.*, vol. 84, no. 1, pp. 55-62, 2005.
- [40] F. J. Perlak, R. L. Fuchs, D. A. Dean, S. L. McPherson, and D. A. Fischhoff, "Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 8, pp. 3324-3328, 1991.
- [41] G. J. A. Rouwendal, O. Mendes, E. J. H. Wolbert, and A. D. de Boer, "Enhanced expression in tobacco of the gene encoding green fluorescent protein by modification of its codon usage," *Plant Mol. Biol.*, vol. 33, pp. 989-999, 1997.
- [42] K. Hiwasa-Tanase, M. Nyarubona, T. Hirai, K. Kato, T. Ichikawa, and H. Ezura, "High-level accumulation of recombinant miraculin protein in transgenic tomatoes expressing a synthetic miraculin gene with optimized codon usage terminated by the native miraculin terminator," *Plant Cell Rep.*, vol. 30, no. 1, pp. 113-124, 2011.
- [43] M. Lagua-Becher *et al.*, "Effect of codon optimization and subcellular targeting on *Toxoplasma gondii* antigen SAG1 expression in tobacco leaves to use in subcutaneous and oral immunization in mice," *BMC Biotechnol.*, vol. 10, p. 52, 2010.
- [44] H. Zhao, K. Blazanovic, Y. Choi, C. Bailey-Kellogg, and K. E. Griswold, "Gene and protein sequence optimization for high-level production of fully active and aglycosylated lysostaphin in *Pichia pastoris*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 9, pp. 2746-2753, 2014.
- [45] E. Angov, C. J. Hillier, R. L. Kincaid, and J. A. Lyon, "Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host," *PLoS One*, vol. 3, no. 5, pp. 1-10, 2008.
- [46] T.-J. Kang, N.-H. Loc, M.-O. Jang, and M.-S. Yang, "Modification of the cholera toxin B subunit coding sequence to enhance expression in plants," *Mol. Breed.*, vol. 13, no. 2, pp. 143-153, 2004.
- [47] T. Nochi *et al.*, "Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 26, pp. 10986-10991, 2007.
- [48] J. F. Cummings *et al.*, "Safety and immunogenicity of a plant-produced recombinant monomer hemagglutinin-based influenza vaccine derived from influenza A (H1N1)pdm09 virus: A Phase 1 dose-escalation study in healthy adults," *Vaccine*, vol. 32, no. 19, pp. 2251-2259, 2014.
- [49] Y. Shoji *et al.*, "Plant-based rapid production of recombinant subunit hemagglutinin vaccines targeting H1N1 and H5N1 influenza," *Hum. Vaccin.*, vol. 7, no. suppl. 1, pp. 41-50, 2011.
- [50] Y. Shoji *et al.*, "Plant-derived hemagglutinin protects ferrets against challenge infection with the A/Indonesia/05/05 strain of avian influenza," *Vaccine*, vol. 27, no. 7, pp. 1087-1092, 2009.
- [51] A. Fuglsang, "Codon optimizer: A freeware tool for codon optimization," *Protein Expr. Purif.*, vol. 31, no. 2, pp. 247-

- 249, 2003.
- [52] E. Egelkrout, V. Rajan, and J. A. Howard, "Overproduction of recombinant proteins in plants," *Plant Sci.*, vol. 184, no. March, pp. 83-101, 2012.
- [53] W. Gao, A. Rzewski, H. Sun, P. D. Robbins, and A. Gambotto, "UpGene: Application of a web-based dna codon optimization algorithm," *Biotechnol. Prog.*, vol. 20, no. 2, pp. 443-448, 2004.
- [54] J. X. Chin, B. K. S. Chung, and D. Y. Lee, "Codon Optimization OnLine (COOL): A web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design," *Bioinformatics*, vol. 30, no. 15, pp. 2210-2212, 2014.
- [55] T. E. F. Quax, N. J. Claassens, D. Söll, and J. van der Oost, "Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression Tessa," *Mol. Cell*, vol. 59, no. 2, pp. 149-161, 2016.
- [56] M. A. Jackson, P. R. Sternes, S. R. Mudge, M. W. Graham, and R. G. Birch, "Design rules for efficient transgene expression in plants," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 12, no. 7, pp. 925-933, 2014.
- [57] A. Cramer, E. A. Whitehorn, E. Tate, and W. P. C. Stemmer, "Improved Green Fluorescent Protein by Molecular Evolution Using DNA Shuffling," *Nat. Biotechnol.*, vol. 14, no. 3, pp. 315-319, Mar. 1996.
- [58] H. S. Padgett, J. A. Lindbo, W. P. Fitzmaurice, and A. A. Vaewhongs, "METHOD OF OPTIMIZING CODON USAGE THROUGH DNA SHUFFLING," US 2011/0111413, 2011.
- [59] C. Roa-Rodriguez, "IP Landscape for Promoters Commonly Used in Plant Biotechnology," no. October 2003, 2003.
- [60] J. T. Odell, F. Nagy, and N.-H. Chua, "Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35s promoter," *Nature*, vol. 313, pp. 810-812, 1985.
- [61] J. T. Odell, S. Knowlton, W. Lin, and C. J. Mauvais, "Properties of an isolated transcription stimulating sequence derived from the cauliflower mosaic virus 35S promoter," *Plant Mol. Biol.*, vol. 10, pp. 263-272, 1988.
- [62] D. Mcelroy, W. Zhang, J. Cao, and R. Wu, "Isolation of an Efficient Actin Promoter for Use in Rice Transformation," *Plant Cell Am. Soc. Plant Physiol.*, vol. 2, no. February, pp. 163-171, 1990.
- [63] M.-J. Cornejo, D. Luth, K. M. Blankenship, O. D. Anderson, and A. E. Blechl, "Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice," *Plant Mol. Biol.*, vol. 23, pp. 567-581, 1993.
- [64] L. Rooke, D. Byrne, and S. Salgueir03, "Marker gene expression driven by the maize ubiquitin promoter in transgenic wheat," 2000.
- [65] R. Kay, A. M. Y. Chan, M. Daly, and J. Mcpherson, "Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes," *Science (80-.)*, vol. 236, no. December 1986, 1987.
- [66] C. Ransom, V. Balan, G. Biswas, B. Dale, E. Crockett, and M. Sticklen, "Heterologous *Acidothermus cellulolyticus* 1, 4- B - Endoglucanase E1 Produced Within the Corn Biomass Converts," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 136, no. 1, pp. 207-219, 2007.
- [67] S. Matic *et al.*, "Comparative analysis of recombinant Human Papillomavirus 8 L1 production in plants by a variety of expression systems and purification methods," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 10, no. 4, pp. 410-421, 2012.
- [68] T. J. Kang, B. G. Kim, J. Y. Yang, and M. S. Yang, "Expression of a synthetic cholera toxin B subunit in tobacco using ubiquitin promoter and bar gene as a selectable marker," *Mol. Biotechnol.*, vol. 32, no. 2, pp. 93-100, 2006.
- [69] O. Guerrero-Andrade, E. Loza-Rubio, T. Olivera-Flores, T. Fehervári-Bone, and M. A. Gómez-Lim, "Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies," *Transgenic Res.*, vol. 15, no. 4, pp. 455-463, 2006.
- [70] S. H. Shah *et al.*, "Use of Different Promoters in Transgenic Plant Development : Current Challenges and Future Perspectives," vol. 15, no. 4, pp. 664-675, 2015.
- [71] Y.-J. Shin, S.-Y. Hong, T.-H. Kwon, Y.-S. Jang, and M.-S. Yang, "High level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension culture.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 82, no. 7, pp. 778-783, 2003.
- [72] L. Dickey, J. Gasdaska, K. Cox, C. G. Peele, and D. Spencer, "Expression of biologically active polypeptides in duckweed," 2005.
- [73] M. Rodriguez-Franco, W. Jost, A. Weise, and G. Gorr, "Moss Expressing Promoting Regions," 2005.
- [74] A. Weise *et al.*, "High-level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the *Physcomitrella* ??-fuc-t ??-xyl-t mutant," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 5, no. 3, pp. 389-401, 2007.
- [75] S. L. Woodard *et al.*, "Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants.," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 38, no. Pt 2, pp. 123-130, 2003.
- [76] M. Kozak, "Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes," *Cell*, vol. 44, no. 2, pp. 283-292, 1986.
- [77] C. Joshi, H. Zhou, X. Huang, and C. VL., "Context sequences of translation initiation codon in plants.," *Plant Mol. Biol.*, vol. 35, no. 6, pp. 993-1001, 1997.
- [78] F. Sainsbury, E. C. Thuenemann, and G. P. Lomonosoff, "pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants," pp. 682-693, 2009.
- [79] Q. Liz and A. G. Hunt, "The Polyadenylation of RNA in Plants," *Plant Physiol*, vol. 115, pp. 321-325, 1997.
- [80] A. G. Hunt, "RNA regulatory elements and polyadenylation in plants.," *Front. Plant Sci.*, vol. 2, no. January, p. 109, 2011.
- [81] G. C. Allen *et al.*, "High-Level Transgene Expression in Plant Cells : Effects of a Strong Scaffold Attachment Region from Tobacco," *Plant Cell*, vol. 8, no. May, pp. 899-913, 1996.
- [82] S. Petrucci *et al.*, "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 Biotechnol. J.*, vol. 4, no. 5, pp. 511-527, 2006.
- [83] U. Conrad and U. Fiedler, "Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity," *Plant Mol. Biol.*, vol. 38, no. 1-2, pp. 101-109, 1998.
- [84] S. Yoseph *et al.*, "System and method for production of antibodies in plant cell culture," US 8119406 B2, 2012.
- [85] V. S. Marin Viegas, C. G. Ocampo, and S. Petrucci, "Vacuolar deposition of recombinant proteins in plant vegetative organs as a strategy to increase yields," *Bioengineered*, vol. 8, no. 3, pp. 203-211, 2017.
- [86] S. Melnik and E. Stoger, "Green factories for biopharmaceuticals," *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 8, pp. 1038-1046, 2013.
- [87] J. Salazar-Gonzalez, "Plastid-Based Expression Strategies," in *Genetically Engineered Plants as a Source of Vaccines Against Wide Spread Diseases: An Integrated View*, 2014, pp. 61-78.
- [88] T. G. Kim *et al.*, "Reduced protease activity in transformed rice cell suspension cultures expressing a proteinase inhibitor," *Protein Expr. Purif.*, vol. 53, no. 2, pp. 270-274, 2007.
- [89] S. Komarnytsky, N. Borisjuk, N. Yakoby, A. Garvey, and I. Raskin, "Cosecretion of protease inhibitor stabilizes antibodies produced by plant roots.," *Plant Physiol.*, vol. 141, no. 4, pp. 1185-93, 2006.
- [90] N. S. Kim *et al.*, "Improvement of recombinant hGM-CSF production by suppression of cysteine proteinase gene expression using RNA interference in a transgenic rice culture," *Plant Mol. Biol.*, vol. 68, no. 3, pp. 263-275, 2008.
- [91] N. S. Kim *et al.*, "Amylase and cysteine proteinase gene knockdown in rice cells using RNA interference for enhancing production of recombinant proteins," *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 114, no. 1, pp. 97-107, 2013.
- [92] Y. Shaaltiel *et al.*, "Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 5, no. 5, pp. 579-590, 2007.
- [93] R. Valdés *et al.*, "Large-scale purification of an antibody directed against hepatitis B surface antigen from transgenic tobacco plants," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 308, no. 1, pp. 94-100, 2003.
- [94] N. Ramírez *et al.*, "Expression and characterization of an anti-hepatitis B surface antigen) glycosylated mouse antibody in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants and its use in the immunopurification of its target antigen," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 38, pp. 223-230, 2003.
- [95] D. J. Maskus *et al.*, "Isolation, production and characterization of fully human monoclonal antibodies directed to *Plasmodium falciparum* MSP10," *Malar. J.*, vol. 14, no. 1, pp. 1-16, 2015.
- [96] A. Y. H. Teh, D. Maresch, K. Klein, and J. K. C. Ma, "Characterization of VRC01, a potent and broadly neutralizing anti-HIV mAb, produced in transiently and stably transformed tobacco," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 12, no. 3, pp. 300-311, 2014.
- [97] V. Yusibov, N. Kushnir, and S. J. Streatfield, "Antibody Production in Plants and Green Algae," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 67, no. 1, pp. 669-701, 2016.
- [98] O. Voinnet, S. Rivas, P. Mestre, and D. Baulcombe, "An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus," *Plant J.*, vol. 33, no. 5, pp. 949-956, 2003.
- [99] H. T. Phan *et al.*, "Influence of Elastin-Like Polypeptide and Hydrophobin on Recombinant Hemagglutinin Accumulations in

- Transgenic Tobacco Plants," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, pp. 2-12, 2014.
- [100] A. J. Conley, J. J. Joensuu, A. Richman, and R. Menassa, "Protein body-inducing fusions for high-level production and purification of recombinant proteins in plants," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 9, no. 4, pp. 419-433, 2011.
- [101] J. J. Joensuu, A. J. Conley, M. Lienemann, J. E. Brandle, M. B. Linder, and R. Menassa, "Hydrophobin Fusions for High-Level Transient Protein Expression and Purification in *Nicotiana benthamiana*," vol. 152, no. February, pp. 622-633, 2010.
- [102] M. Delic, R. Gögrich, D. Mattanovich, and B. Gasser, "Engineering of protein folding and secretion-strategies to overcome bottlenecks for efficient production of recombinant proteins.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 21, no. 3, pp. 414-37, 2014.
- [103] Y. Zhou, R. Raju, C. Alves, and A. Gilbert, "Debottlenecking protein secretion and reducing protein aggregation in the cellular host," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 53, pp. 151-157, 2018.
- [104] A. Vitale and A. Ceriotti, "Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests?," *Plant Physiol.*, vol. 136, no. November, pp. 3420-3426, 2004.
- [105] D. M. Dinnis and D. C. James, "Engineering mammalian cell factories for improved recombinant monoclonal antibody production: Lessons from nature?," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 91, no. 2, pp. 180-189, 2005.
- [106] K. De Wilde, S. De Buck, K. Vanneste, and A. Depicker, "Recombinant antibody production in *Arabidopsis* seeds triggers an unfolded protein response.," *Plant Physiol.*, vol. 161, no. 2, pp. 1021-33, 2013.
- [107] C. Y. Liu, "The unfolded protein response," *J. Cell Sci.*, vol. 116, no. 10, pp. 1861-1862, 2003.
- [108] Y. Iwata and N. Koizumi, "Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response," *Trends Plant Sci.*, vol. 17, no. 12, pp. 720-727, 2012.
- [109] W. Dröge-Laser, B. L. Snoek, B. Snel, and C. Weiste, "The *Arabidopsis* bZIP transcription factor family – an update," *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 45, pp. 36-49, 2018.
- [110] J.-X. Liu, R. Srivastava, and S. H. Howell, "Stress-induced expression of an activated form of AtbZIP17 provides protection from salt stress in *Arabidopsis*," *Plant Cell Environ.*, vol. 31, no. 12, pp. 1735-43, Dec. 2008.
- [111] J.-X. Liu, R. Srivastava, P. Che, and S. H. Howell, "Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling.," *Plant J.*, vol. 51, no. 5, pp. 897-909, 2007.
- [112] C. Ruberti, Y. Lai, and F. Brandizzi, "Recovery from temporary endoplasmic reticulum stress in plants relies on the tissue-specific and largely independent roles of bZIP28 and bZIP60, as well as an antagonizing function of BAX-Inhibitor 1 upon the pro-adaptive signaling mediated by bZIP28," *Plant J.*, vol. 93, pp. 155-165, 2018.
- [113] J.-S. Kim, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki, "ER-Anchored Transcription Factors bZIP17 and bZIP28 Regulate Root Elongation," *Plant Physiol.*, vol. 176, no. March, p. pp.01414.2017, 2018.
- [114] J. Kim, K. Yamaguchi-shinozaki, and K. Shinozaki, "ER-Anchored Transcription Factors bZIP17 and bZIP28 regulate root elongation," *Plant Physiol.*, vol. 176, no. March, pp. 2221-2230, 2018.
- [115] C. Henriquez-Valencia *et al.*, "bZIP17 and bZIP60 Regulate the Expression of BiP3 and Other Salt Stress Responsive Genes in an UPR-Independent Manner in *Arabidopsis thaliana*," *J. Cell. Biochem.*, vol. 116, no. 8, pp. 1638-1645, 2015.
- [116] M. Yáñez *et al.*, "An abiotic stress-responsive bZIP transcription factor from wild and cultivated tomatoes regulates stress-related genes.," *Plant Cell Rep.*, vol. 28, no. 10, pp. 1497-1507, 2009.
- [117] R. Srivastava, Y. Deng, and S. H. Howell, "Stress sensing in plants by an ER stress sensor/transducer, bZIP28.," *Front. Plant Sci.*, vol. 5, no. February, p. 59, 2014.
- [118] N. Cifuentes-Esquivel *et al.*, "bZIP17 regulates the expression of genes related to seed storage and germination, reducing seed susceptibility to osmotic stress," *J. Cell. Biochem.*, no. January, pp. 1-12, 2018.
- [119] A. Rahimpour *et al.*, "Engineering the cellular protein secretory pathway for enhancement of recombinant tissue plasminogen activator expression in Chinese hamster ovary cells: Effects of CERT and XBP1s genes," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 23, no. 8, pp. 1116-1122, 2013.
- [120] R. E. Cudna and A. J. Dickson, "Endoplasmic Reticulum Signaling as a Determinant of Recombinant Protein Expression," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 81, no. 1, pp. 56-65, 2003.
- [121] E. Van Anken and I. Braakman, "Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 40, no. 4, pp. 191-228, 2005.
- [122] J. Tellier *et al.*, "Blimp-1 controls plasma cell function through regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response," *Nat Immunol.*, vol. 17, no. 3, pp. 323-330, 2016.
- [123] C. Alexander Turner, D. H. Mack, and M. M. Davis, "Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells," *Cell*, vol. 77, no. 2, pp. 297-306, 1994.
- [124] R. Sciammas and M. M. Davis, "Blimp-1; immunoglobulin secretion and the switch to plasma cells.," *Curr Top Microbiol Immunol.*, vol. 290, pp. 201-224, 2005.
- [125] K. Calame, "Activation-dependent induction of Blimp-1," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 20, no. 3, pp. 259-264, 2008.
- [126] A. L. Shaffer *et al.*, "XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation," *Immunity*, vol. 21, no. 1, pp. 81-93, 2004.
- [127] A. M. Reimold *et al.*, "Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1," *Nature*, vol. 412, no. 6844, pp. 300-307, 2001.
- [128] Y. He *et al.*, "Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor," *Gene Expr.*, vol. 15, no. 1, pp. 13-25, 2010.
- [129] J. L. Brodsky and W. R. Skach, "Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 23, no. 4, pp. 464-475, 2011.
- [130] J. C. de Ruijter, E. V. Koskela, and A. D. Frey, "Enhancing antibody folding and secretion by tailoring the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum," *Microb. Cell Fact.*, vol. 15, no. 1, pp. 1-18, 2016.
- [131] E. Egelkrou, V. Rajan, and J. A. Howard, "Overproduction of recombinant proteins in plants," *Plant Sci.*, no. March 2016, 2012.
- [132] S. J. Streatfield, "Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 5, no. 1, pp. 2-15, 2007.
- [133] K. K. Ullrich, M. Hiss, and S. A. Rensing, "Means to optimize protein expression in transgenic plants," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 32, pp. 61-67, 2015.
- [134] S. Dutta Gupta and A. Agarwal, "Artificial Lighting System for Plant Growth and Development: Chronological Advancement, Working Principles, and Comparative Assessment," in *Light Emitting Diodes for Agriculture*, Singapore: Springer Singapore, 2017, pp. 1-25.
- [135] C. I. Cazonelli and J. Velten, "An in vivo, luciferase-based, *Agrobacterium*-infiltration assay system: Implications for post-transcriptional gene silencing," *Planta*, vol. 224, no. 3, pp. 582-597, 2006.
- [136] A. Carraro, J. Faulkner, Y. Klipfel, O. Mironov, K. Oishi, and S. Roesti, "Methods for producing proteins in plants," 2016.
- [137] R. Matsuda, A. Tahara, N. Matoba, and K. Fujiyama, "Virus Vector-Mediated Rapid Protein Production in *Nicotiana benthamiana*: Effects of Temperature and Photosynthetic Photon Flux Density on Hemagglutinin Accumulation," *Environ. Control Biol.*, vol. 50, no. 4, pp. 375-381, 2012.
- [138] M. Murase, D. Kitahara, N. Ikezawa, and H. Tanaka, "Method For Producing Protein In Plants Using Lighting With At Least 50% Red Light," US10,125,370 B2, 2018.
- [139] M. Shamloul, J. Trusa, V. Mett, and V. Yusibov, "Optimization and Utilization of *Agrobacterium*-mediated Transient Protein Production in *Nicotiana*," *J. Vis. Exp.*, no. 86, pp. 1-13, 2014.
- [140] L. Ma, E. Lukasik, F. Gawehns, and F. L. W. Takken, "The Use of Agroinfiltration for Transient Expression of Plant Resistance and Fungal Effector Proteins in *Nicotiana benthamiana* Leaves," in *Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols*, vol. 835, 2012, pp. 61-74.
- [141] S. Petrucelli, M. I. Molina, F. J. Lareu, and A. Circosta, "Two short sequences from amaranth 11S globulin are sufficient to target green fluorescent protein and beta-glucuronidase to vacuoles in *Arabidopsis* cells," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 45, no. 6-7, pp. 400-409, 2007.
- [142] Y. Iwata, N. V. Fedoroff, and N. Koizumi, "The *Arabidopsis* membrane-bound transcription factor AtbZIP60 is a novel plant-specific endoplasmic reticulum stress transducer.," *Plant Signal. Behav.*, vol. 4, no. 6, pp. 514-6, 2009.
- [143] Z. Li and T. L. Thomas, "PEI1, an embryo-specific zinc finger protein gene required for heart-stage embryo formation in *Arabidopsis*," *Plant Cell*, vol. 10, no. 3, pp. 383-398, 1998.
- [144] S. Bogamuwa and J. C. Jang, "Plant Tandem CCCH Zinc finger proteins interact with ABA, drought, and stress response regulators in processing-bodies and stress granules," *PLoS*

- One*, vol. 11, no. 3, pp. 1-18, 2016.
- [145] D. Wang, Y. Guo, C. Wu, G. Yang, Y. Li, and C. Zheng, "Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in Arabidopsis and rice." *BMC Genomics*, vol. 9, p. 44, 2008.
- [146] A. Vitale and R. S. Boston, "Endoplasmic reticulum quality control and the unfolded protein response: Insights from plants," *Traffic*, vol. 9, no. 10, pp. 1581-1588, 2008.
- [147] N. Cifuentes-esquivel, I. Mitina, C. Meneses, J. C. C. Henriquez-valencia, A. Orellana, and P. A. A. Moreno, "bZIP17 regulates the expression of genes related to seed storage and germination , reducing seed susceptibility to osmotic stress," no. March, 2018.
- [148] H. Wang *et al.*, "Reference genes for normalizing transcription in diploid and tetraploid," no. Table 1, pp. 1-8, 2014.
- [149] B. H. Le *et al.*, "Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors.," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 107, no. 18, pp. 8063-70, 2010.
- [150] A. Castilho *et al.*, "N-Glycosylation engineering of plants for the biosynthesis of glycoproteins with bisected and branched complex N -glycans," vol. 21, no. 6, pp. 813-823, 2011.
- [151] J. H. Cafiero and S. Petruccielli, "Construcción de scFv multiméricos y estudio de su expresión temporal en hojas de Nicotiana benthamiana," *Univ. Nac. La Plata, Fac. Ciencias Exactas.*, 2012.
- [152] K. W. Earley *et al.*, "Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics," *Plant J.*, vol. 45, no. 4, pp. 616-629, 2006.
- [153] T. Nakagawa *et al.*, "Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation.," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 104, no. 1, pp. 34-41, 2007.
- [154] F. Sainsbury, E. C. Thuememann, and G. P. Lomonosoff, "PEAQ: Versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 7, no. 7, pp. 682-693, 2009.
- [155] C. G. Ocampo *et al.*, "Vacuolar targeting of recombinant antibodies in Nicotiana benthamiana," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 14, no. 12, pp. 2265-2275, 2016.
- [156] S. J. Streatfield, N. Kushnir, and V. Yusibov, "Plant-produced candidate countermeasures against emerging and reemerging infections and bioterror agents," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 13, no. 8, pp. 1136-1159, 2015.
- [157] E. Mäntylä and B. L. Örvär, "Molecular Farming," in *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2014, pp. 249-267.
- [158] M. J. Paul, H. Thangaraj, and J. K. C. Ma, "Commercialization of new biotechnology: A systematic review of 16 commercial case studies in a novel manufacturing sector," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 13, no. 8, pp. 1209-1220, 2015.
- [159] B. R. Holtz *et al.*, "Commercial-scale biotherapeutics manufacturing facility for plant-made pharmaceuticals," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 13, no. 8, pp. 1180-1190, 2015.
- [160] C. Maronedze *et al.*, "Towards a tailored indoor horticulture: a functional genomics guided phenotypic approach," *Hortic. Res.*, vol. 5, no. 68, 2018.
- [161] R. Matsuda, "Viral vector-based transient gene expression in Nicotiana benthamiana : effects of light source on leaf temperature and hemagglutinin content," *Plant Cell Rep.*, pp. 1-3, 2017.
- [162] M. Janda *et al.*, "Growth and stress response in Arabidopsis thaliana , Nicotiana benthamiana , Glycine max , Solanum tuberosum and Brassica napus cultivated under polychromatic LEDs," pp. 1-14, 2015.
- [163] I. V. Gafitskaya *et al.*, "Growth of Solanum tuberosum plantlets in vitro under LED light sources," no. January, pp. 12-17, 2019.
- [164] J. H. Norikane, "The Potential of LEDs in Plant-based Bio-pharmaceutical Production," *HortScience*, vol. 50, no. 9, pp. 1289-1292, 2015.
- [165] K. Okamoto *et al.*, "Development of plant growth apparatus using blue and red led as artificial light source," *Acta Hort.*, pp. 111-116, 1996.
- [166] Y. Park and E. S. Runkle, "Spectral effects of light-emitting diodes on plant growth , visual color quality , and photosynthetic photon efficacy : White versus blue plus red radiation," pp. 1-14, 2018.
- [167] S. Kim, E. Hahn, J. Heo, and K. Paek, "Effects of LEDs on net photosynthetic rate , growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets in vitro," vol. 101, pp. 143-151, 2004.
- [168] E. Goto, "Plant Production in a Closed Plant Factory with Artificial Lighting," pp. 37-50, 2012.
- [169] J. E. Faust, "Light management in greenhouses. Daily light integral: a useful tool for the US floriculture industry.," p. 31, 2002.
- [170] "Growing Seedlings Under LEDs : Part Two," no. February, 2014.
- [171] K. M. Folta and K. S. Childers, "Light as a Growth Regulator : Controlling Plant Biology with Narrow-bandwidth Solid-state Lighting Systems," vol. 43, no. June, pp. 1957-1964, 2008.
- [172] M. Senthil-Kumar, G. Govind, L. Kang, K. Mysore, and M. Udayakumar, "Functional characterization of Nicotiana benthamiana homologs of peanut water deficit-induced genes by virus-induced gene silencing," *Planta*, vol. 225, pp. 523-539, 2007.
- [173] X. Li, Y. Zhang, L. Yin, and J. Lu, "Overexpression of pathogen-induced grapevine TIR-NB-LRR gene VaRGA1 enhances disease resistance and drought and salt tolerance in Nicotiana benthamiana," *Protoplasma*, 2016.
- [174] C. Kotakis, N. Vrettos, D. Kotsis, M. Tsagris, K. Kotzabasis, and K. Kalantidis, "Light intensity affects RNA silencing of a transgene in Nicotiana benthamiana plants.," *BMC Plant Biol.*, vol. 10, p. 220, 2010.
- [175] N. Fujiuchi, N. Matoba, and R. Matsuda, "Environment Control to Improve Recombinant Protein Yields in Plants Based on Agrobacterium-Mediated Transient Gene Expression," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 4, no. March, pp. 1-6, 2016.
- [176] R. Matsuda, T. Abe, N. Fujiuchi, N. Matoba, and K. Fujiwara, "Effect of temperature post viral vector inoculation on the amount of hemagglutinin transiently expressed in Nicotiana benthamiana leaves," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 124, no. 3, pp. 346-350, 2017.
- [177] M. Benchabane, C. Goulet, D. Rivard, L. Faye, V. Gomord, and D. Michaud, "Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories," *Plant Biotechnol. J.*, vol. 6, no. 7, pp. 633-648, 2008.
- [178] K. Moustafa, A. Makhzoum, and J. Trémouillaux-Guiller, "Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 8551, no. July, pp. 1-11, 2015.
- [179] J. Liu, R. Srivastava, P. Che, and S. Howell, "Salt stress signaling in Arabidopsis thaliana involves a membrane-bound transcription factor AtbZIP17 as a signal transducer.," *Plant Signal. Behav.*, vol. 3, no. 1, pp. 56-7, 2008.
- [180] N. Cifuentes-Esquivel *et al.*, "bZIP17 regulates the expression of genes related to seed storage and germination, reducing seed susceptibility to osmotic stress," *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 8, pp. 6857-6868, 2018.
- [181] M. Valkonen, M. Penttilä, and M. Saloheimo, "Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded-protein response pathway on protein production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 4, pp. 2065-72, 2003.
- [182] M. Tigges and M. Fussenegger, "Xbp1-based engineering of secretory capacity enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells," *Metab. Eng.*, vol. 8, no. 3, pp. 264-272, 2006.
- [183] M. Guerfal *et al.*, "The HAC1 gene from *Pichia pastoris* : characterization and effect of its overexpression on the production of secreted , surface displayed and membrane proteins," pp. 1-12, 2010.
- [184] M. Fujita *et al.*, "Identification of stress-tolerance-related transcription-factor genes via mini-scale Full-length cDNA Over-eXpressor (FOX) gene hunting system," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 364, no. 2, pp. 250-257, 2007.
- [185] Y. Deng, R. Srivastava, and S. H. Howell, "Endoplasmic reticulum (ER) stress response and its physiological roles in plants," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 4, pp. 8188-8212, 2013.
- [186] H. Peyret and G. P. Lomonosoff, "The pEAQ vector series: The easy and quick way to produce recombinant proteins in plants," *Plant Mol. Biol.*, vol. 83, no. 1-2, pp. 51-58, 2013.
- [187] H. Tajima, Y. Iwata, M. Iwano, S. Takayama, and N. Koizumi, "Identification of an Arabidopsis transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 374, no. 2, pp. 242-247, 2008.
- [188] J.-X. Liu and S. H. Howell, "bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in Arabidopsis.," *Plant Cell*, vol. 22, no. 3, pp. 782-796, 2010.
- [189] C. D. Deppmann *et al.*, "Dimerization specificity of all 67 B-ZIP motifs in Arabidopsis thaliana: A comparison to Homo sapiens B-ZIP motifs," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 11, pp. 3435-3445, 2004.
- [190] H. Bommasamy *et al.*, "ATF6 α induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum," vol. 1, 2007.
- [191] J. Klabunde, S. Kleebank, M. Piontek, C. P. Hollenberg, S.

- Hellwig, and A. Degelmann, "Increase of calnexin gene dosage boosts the secretion of heterologous proteins by *Hansenula polymorpha*," vol. 7, pp. 1168-1180, 2007.
- [192] M. D. Kim, K. C. Han, H. A. Kang, S. K. Rhee, and J. H. Seo, "Coexpression of BiP increased antithrombotic hirudin production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biotechnol.*, vol. 101, no. 1, pp. 81-87, 2003.
- [193] M. Lombrana, F. J. Moralejo, R. Pinto, and J. F. Martín, "Modulation of *Aspergillus awamori* thaumatin secretion by modification of *bipA* gene expression," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 9, pp. 5145-5152, 2004.
- [194] E. Becker, L. Florin, K. Pfizenmaier, and H. Kaufmann, "An XBP-1 dependent bottle-neck in production of IgG subtype antibodies in chemically defined serum-free Chinese hamster ovary (CHO) fed-batch processes," *J. Biotechnol.*, vol. 135, no. 2, pp. 217-223, 2008.
- [195] E. Shusta, R. Ronald, A. Plückthun, and K. D. Wittrup, "Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments," *Nat. Biotechnol.*, vol. 16, no. 10, pp. 773-777, 1998.
- [196] C. Ye, S. Chen, M. Payton, M. B. Dickman, and J. Verchot, "TGBp3 triggers the unfolded protein response and SKP1-dependent programmed cell death," vol. 14, pp. 241-255, 2013.
- [197] L. Zhang, H. Chen, F. Brandizzi, J. Verchot, and A. Wang, "The UPR Branch IRE1- bZIP60 in Plants Plays an Essential Role in Viral Infection and Is Complementary to the Only UPR Pathway in Yeast," pp. 1-37, 2015.
- [198] Z. Sun *et al.*, "Rice black - streaked dwarf virus P10 induces membranous structures at the ER and elicits the unfolded protein response in *Nicotiana benthamiana*," *Virology*, vol. 447, no. 1-2, pp. 131-139, 2013.
- [199] Y. Lu *et al.*, "The unfolded protein response and programmed cell death are induced by expression of Garlic virus X p11 in *Nicotiana benthamiana*," *J. Gen. Virol.*, vol. 97, pp. 1462-1468, 2016.
- [200] L. Zhang and A. Wang, "Virus-induced ER stress and the unfolded protein response," vol. 3, no. December, pp. 1-16, 2012.
- [201] E. Aguilar, C. Brosseau, P. Moffett, and F. Tenllado, "Cell death triggered by the P25 protein in Potato virus X - associated synergisms results from ER stress in *Nicotiana benthamiana*," *Mol. Plant Pathol.*, pp. 0-2, 2018.
- [202] C. Ye, M. B. Dickman, S. A. Whitham, M. Payton, and J. Verchot, "The Unfolded Protein Response Is Triggered by a Plant Viral Movement Protein," *Plant Physiol.*, vol. 156, no. 2, pp. 741-755, 2011.
- [203] G. Gulis, K. Cristina, R. Simi, R. R. De Toledo, A. Q. Maranhao, and M. M. Brigido, "Optimization of heterologous protein production in Chinese hamster ovary cells under overexpression of spliced form of human X-box binding protein," *BMC Biotechnol.*, vol. 14, no. 1, pp. 1-12, 2014.
- [204] H. Bommiasamy *et al.*, "ATF6a induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum," *J. Cell Sci.*, vol. 122, pp. 1626-1636, 2009.
- [205] M. A. Restrepo, D. D. Freed, and J. C. Carrington, "Nuclear transport of plant potyviral proteins," *Plant Cell*, vol. 2, no. 10, pp. 987-98, Oct. 1990.
- [206] H. Batoko, H. Zheng, C. Hawes, and I. Moore, "A Rab1 GTPase Is Required for Transport between the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus and for Normal Golgi Movement in Plants," vol. 12, no. November, pp. 2201-2217, 2000.
- [207] P. K. Smith *et al.*, "Measurement of protein using bicinchoninic acid," *Anal. Biochem.*, vol. 150, no. 1, pp. 76-85, Oct. 1985.
- [208] R. A. Jefferson, "Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system," *Plant Mol. Biol. Report.*, vol. 5, no. 4, pp. 387-405, Dec. 1987.

ANEXOS



ANEXO I

Optimización de las condiciones de medida y extracción para las proteínas reporteras ensayadas.

Optimización de la condición de extracción para la enzima β -glucuronidasa.

Para evaluar correctamente los niveles de acumulación de la enzima β -glucuronidasa fue necesario previamente encontrar la mejor condición de extracción para las muestras en términos de la composición del buffer de extracción y los días posinfiltración para realizar la cosecha de las hojas.

Se evaluó la actividad de la enzima GUS en extractos de hojas de *Nicotiana benthamiana* realizados utilizando diferentes buffers, con el objetivo de optimizar el proceso de extracción y minimizar la proteólisis durante este proceso. Sabiendo que la enzima β -glucuronidasa codificada por el gen uidA de *E. coli* es estable en un amplio rango de pH y en presencia de algunos detergentes [208], y que la presencia de sales puede mejorar la eficiencia del proceso de extracción, se procedió a evaluar el efecto del agregado de una sal como el cloruro de sodio, de surfactantes como Tritón X-100 y SDS y del pH en el buffer de extracción. Para esto, hojas de *N. benthamiana* infiltradas con una suspensión de agrobacterias que llevaban la construcción RE-GUS a una $DO_{600}=0,4$ (figura 16). A los 5 días postinfiltración se realizaron extractos utilizando distintos buffers fosfato con EDTA que diferían entre sí, en primer lugar, por el agregado de sal o de surfactantes y luego, según su valor de pH (tabla A1). Luego se determinó la actividad de la enzima β -glucuronidasa para cada extracto, utilizando el método fluororimétrico descrito en el punto 2.16 de Materiales y Métodos y la misma cantidad de proteínas solubles totales (PST) para cada muestra.

Tabla A1: Composición de los distintos buffers de extracción ensayados para de la enzima GUS.

Efecto de la sal y surfactantes		
Buffer	Denominación	Composición*
Buffer fosfato con EDTA	BF	7,8mM Na ₂ HPO ₄ ; 12,2mM KH ₂ PO ₄ ; 10mM EDTA; pH=7.
Buffer fosfato con EDTA adicionado con NaCl	BF+NaCl	7,8mM Na ₂ HPO ₄ ; 12,2mM KH ₂ PO ₄ ; 1mM EDTA; 0,5M NaCl; pH=7.
Buffer fosfato con EDTA adicionado con Tritón X-100	BF+T	7,8mM Na ₂ HPO ₄ ; 12,2mM KH ₂ PO ₄ ; 12,2mM KH ₂ PO ₄ ; 10mM EDTA; 0,1% Tritón X-100; pH=7
Buffer fosfato con EDTA adicionado con Tritón X-100 y SDS	BF+T+S	20mM Na ₂ HPO ₄ ; 10mM EDTA; 0,1% Tritón X-100; 0,1% SDS; pH=7.
Efecto del pH		
Buffer	Denominación	Composición*
Buffer fosfato con EDTA y NaCl a pH=7	pH7	7,8mM Na ₂ HPO ₄ ; 12,2mM KH ₂ PO ₄ ; 1mM EDTA; 0,5M NaCl, pH=7.
Buffer fosfato con EDTA y NaCl a pH=6	pH6	12,5mM Na ₂ HPO ₄ ; 17,5mM KH ₂ PO ₄ ; 1mM EDTA; 0,5M NaCl; pH=6.
Buffer fosfato con EDTA y NaCl a pH=5	pH5	1mM Na ₂ HPO ₄ ; 19mM KH ₂ PO ₄ ; 1mM EDTA; 0,5M NaCl; pH=5.

*La concentración final de fosfatos para todos los buffers es 20mM.

Los resultados del efecto del agregado de sal o surfactantes al buffer de extracción para GUS, se muestran en la figura A.1 panel A. La mejor condición de extracción fue aquella en la que se agrega NaCl al buffer de extracción y en ausencia de surfactantes. Teniendo en cuenta estos resultados, el efecto del pH se estudió utilizando este mismo buffer (figura A.1 panel B). La actividad GUS presente en los extractos, disminuyó a medida que bajaba el pH, siendo la mejor condición de extracción aquella que utiliza un buffer fosfato a pH=7.

A partir de estos resultados, se pudo concluir que la mejor condición para realizar la extracción de la enzima β -glucuronidasa a partir de hojas de *N. benthamiana* es aquella en la que se

utiliza el buffer fosfato a pH=7 (pH7) cuya composición es: 7,8mM Na₂HPO₄; 12,2mM KH₂PO₄; 1mM EDTA; 0,5M NaCl, pH=7.

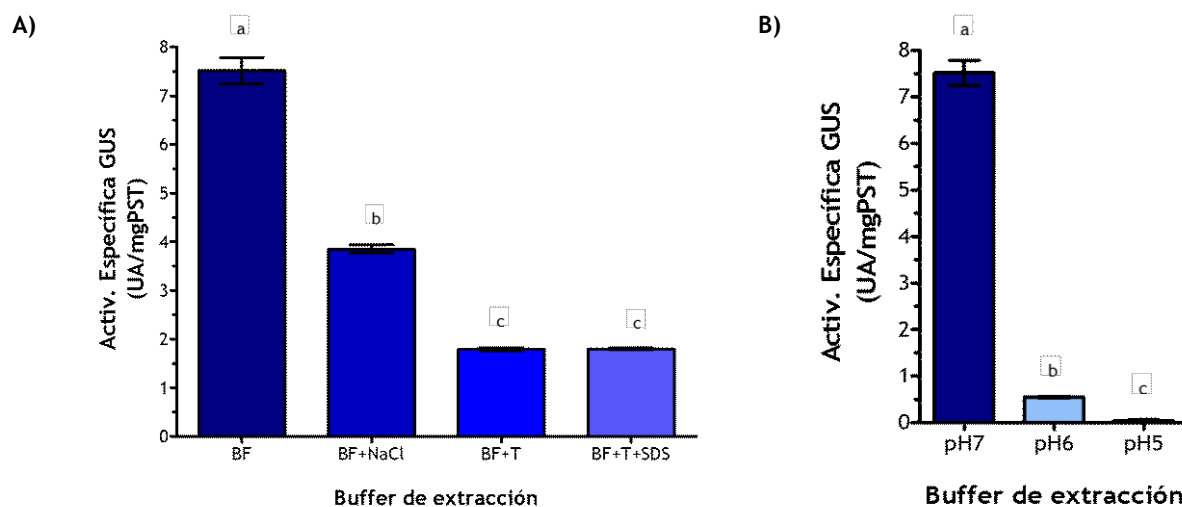


Figura A1: Efecto de la composición del buffer sobre el proceso de extracción de la enzima β-glucuronidasa. Se realizaron extractos de hojas de *N. benthamiana* que expresaban transitoriamente la enzima GUS, y se evaluaron distintos buffers de extracción descritos en la tabla 7. Las distintas condiciones evaluadas permitieron estudiar el efecto de la presencia de sal y surfactantes (derecha) y el efecto del pH (izquierda) en el buffer de extracción.

La mejor condición de extracción es aquella en la que se utilizó un buffer fosfato con EDTA y NaCl a pH=7, obteniéndose mayor actividad enzimática GUS en los extractos realizados con este buffer. La presencia de NaCl mejora la extracción de GUS mientras que el agregado de detergentes afecta negativamente al proceso de extracción. Los resultados se presentan como actividad específica GUS en unidades arbitrarias (UA) que se definen como las unidades de fluorescencia por minuto generadas por la enzima GUS presente en 1mg de proteína soluble total (PST). Este ensayo se realizó por triplicado; las barras de error muestran el desvío estándar y se realizó un test ANOVA y el test de comparación múltiple de Tukey para evaluar diferencias significativas entre las muestras. Letras diferentes indican muestras estadísticamente diferentes (n=3 plantas; P<0,01).

Optimización de la medida de fluorescencia para la proteína fluorescente verde.

Para evaluar los niveles de acumulación de la proteína fluorescente verde (GFP) por determinación de fluorescencia verde, fue necesario en primer lugar, optimizar las condiciones de medida. Se realizaron agroinfiltraciones de hojas de *Nicotiana benthamiana* con una suspensión de bacterias de DO₆₀₀=0,1 transformadas con la construcción RE-GFP, representada en la figura 16. Pasados 3 días postinfiltración, se realizaron extractos de hojas que no habían sido transformadas (*wild type*, wt) y hojas que expresaban GFP. Estos extractos se utilizaron para determinar el seteo del equipo y el buffer de extracción a utilizar para la determinación de los niveles de fluorescencia verde. Para ajustar el seteo del equipo se analizaron tres condiciones de medida diferentes, evaluando dos longitudes de onda de excitación (λ_{ex}), 360±40nm y 485±20nm, y dos longitudes de onda de emisión (λ_{em}), 460±40nm y 528±20nm tal como se detalla en la figura A2, panel A. Los resultados mostraron que la mejor condición de medida para GFP en los extractos es la de λ_{ex} =485±20nm; λ_{em} =528±20nm, en donde los niveles de fluorescencia son mayores para el extracto de GFP y mínimos para el extracto wt. Para todos los casos los niveles de fluorescencia se corrigieron por la concentración de proteínas solubles totales presentes en cada extracto.

Luego, se evaluaron dos buffers distintos para la extracción de la proteína GFP: un buffer carbonato (Na₂CO₃ 0,1M; pH=9) y un buffer fosfato (7,8mM Na₂HPO₄; 12,2mM KH₂PO₄; 1mM EDTA; 0,5M NaCl; pH=7) (figura A2 panel B). Los resultados mostraron que los niveles de fluorescencia son mayores cuando el extracto se realiza en buffer fosfato. Además, se evaluó la estabilidad de la proteína en cada buffer de extracción ensayado, realizando medidas inmediatamente después de realizado el extracto (t=0) y 4 horas después (t=4). Estas medidas mostraron que la proteína GFP es mucho más estable en buffer fosfato, donde los niveles de fluorescencia disminuyeron solo en un 5% luego de 4 horas después de la extracción, mientras que para el buffer carbonato, estos niveles disminuyeron casi un 50%, alcanzando valores similares al *wild type*. Para todos los casos los niveles

de fluorescencia se corrigieron por la concentración de proteínas solubles totales presentes en cada extracto.

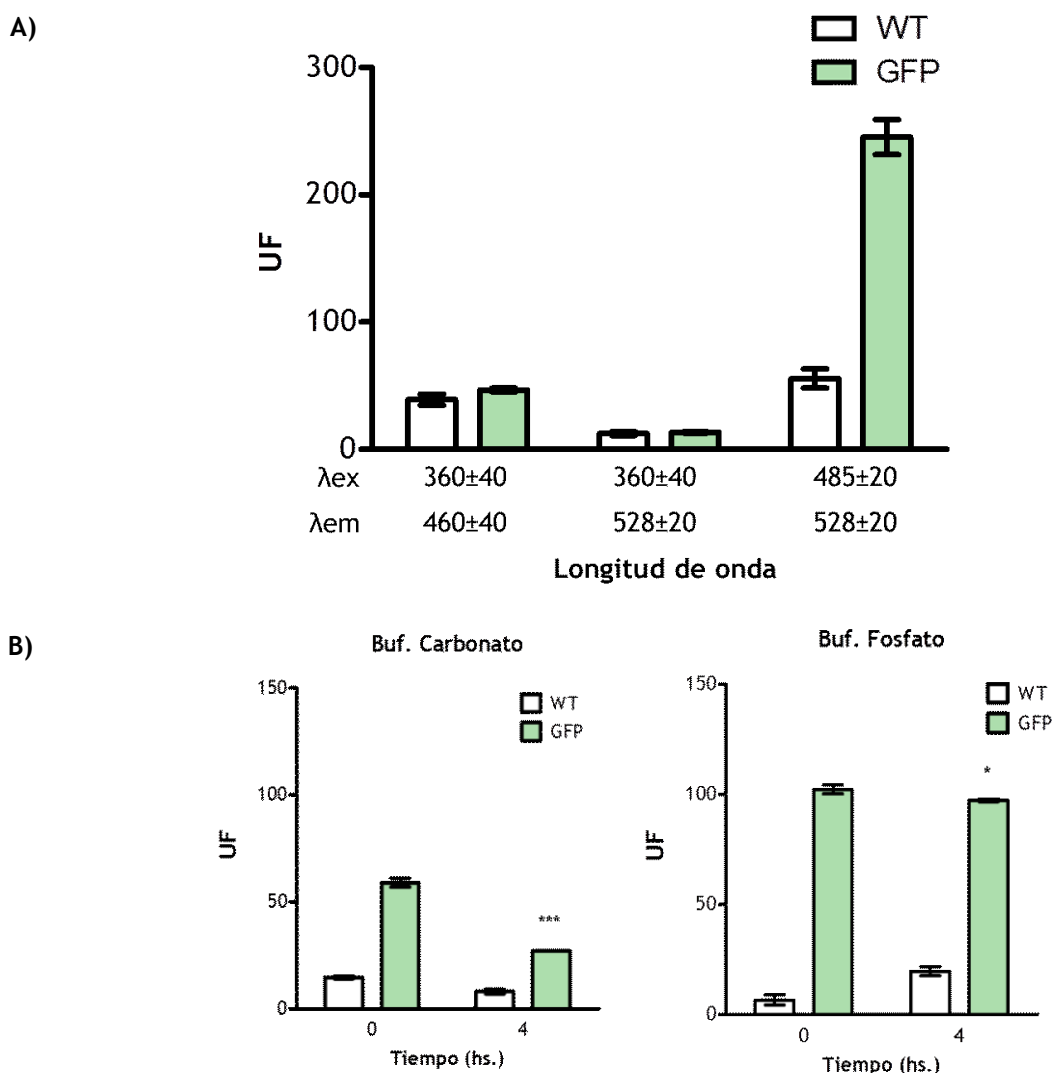


Figura A2: Optimización de las condiciones de extracción y de medida de hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas con GFP-RE. Se evaluaron distintas condiciones de medida en cuanto al seteo del equipo (A) y el buffer de extracción utilizado (B). Para todos los casos, se utilizaron extractos de hojas sin transformar (*wild type*, wt) y extractos de hojas infiltradas con la construcción para GFP (GFP). Para el seteo del equipo (A) se probaron distintas longitudes de onda de excitación y emisión para medir los niveles de fluorescencia verde presentes en los extractos. La mejor condición de medida fue: $\lambda_{ex}=485\pm20$ y $\lambda_{em}=528\pm20$. Para evaluar el efecto de la composición del buffer de extracción sobre la medida de fluorescencia de GFP (B), se realizaron medidas en extractos realizados en buffer carbonato o buffer fosfato. También se ensayó la estabilidad de GFP en cada uno de los buffers utilizados. El mejor buffer de extracción para GFP fue el buffer fosfato, en el cuál la proteína es también más estable. Estos ensayos se realizaron por triplicado. Las barras representan las unidades de fluorescencia con su desvío estándar. Se realizó un t-test entre las medidas de fluorescencia a tiempo 0hs, y 4hs para los extractos que expresan GFP. (*: $p<0,1$; ***: $p<0,01$).

De acuerdo con los resultados mostrados, las posteriores determinaciones de niveles de GFP, se realizaron con un buffer fosfato midiendo a $\lambda_{ex}=485\pm20\text{nm}$; $\lambda_{em}=528\pm20\text{nm}$.

Optimización de la medida de fluorescencia roja para evaluar los niveles del anticuerpo simple cadena 2G3 (RE-RFP-2G3).

Para evaluar los niveles de acumulación del anticuerpo simple cadena 2G3 (RE-RFP-2G3) por cuantificación de fluorescencia roja, debieron encontrarse primero las condiciones óptimas de medida. Para esto, se partió del seteo utilizado comúnmente en microscopía confocal para visualizar la proteína fluorescente roja (RFP) en donde se utiliza una longitud de onda de excitación

de 543nm. Dado que esta longitud de onda puede excitar también a pigmentos presentes en los extractos de hoja, principalmente la clorofila, se realizó un ensayo para encontrar la longitud de onda de emisión a la cual exista una menor interferencia de estos pigmentos. Para esto, se realizaron extractos de hojas de *N. benthamiana*, sin transformar (wt) y transformadas con la proteína fluorescente roja (RE-RFP) utilizando el buffer de extracción de RE-REF-2G3. Estos extractos se utilizaron luego para realizar un espectro de emisión, fijando la longitud de onda de excitación en 543nm. Las medidas se realizaron según lo detallado en el punto 2.18 de la sección de Materiales y Métodos y los valores de fluorescencia fueron corregidos por la concentración de proteínas totales de cada extracto.

La figura A3 muestra los resultados de este ensayo, a partir del cual se seleccionó una longitud de onda de emisión de 611nm, donde la muestra de RFP mostró su máximo de fluorescencia y la interferencia de los pigmentos vegetales es mínima.

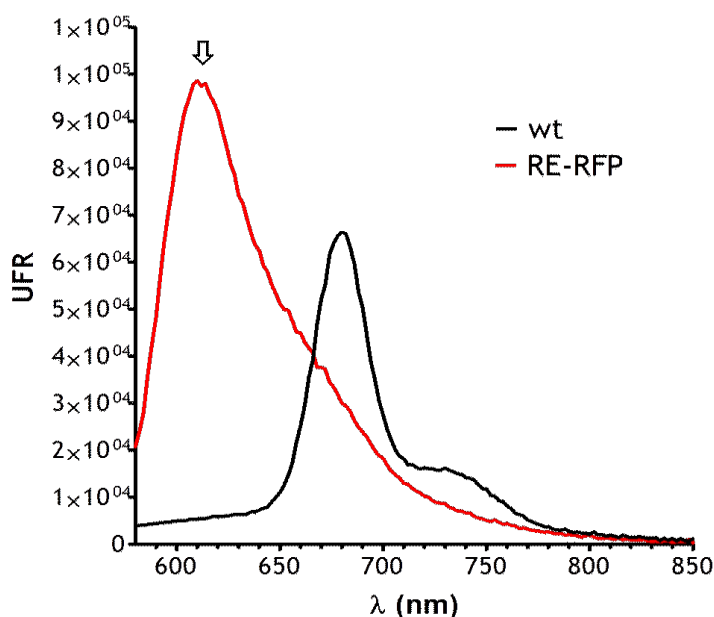


Figura A3: Espectro de emisión para la cuantificación de fluorescencia roja en extractos de hojas de *N. benthamiana*. Se muestran los espectros de emisión de extractos de hojas sin transformar (wt) y transformadas con RFP retenida en el retículo endoplasmático (RE-RFP). La longitud de onda de excitación fue establecida en 543nm. La mejor condición para la medida de RFP es la de una longitud de onda de emisión de 611nm, indicada con una flecha (⇓) para la cual el extracto de RFP muestra un máximo de fluorescencia y la muestra wt muestra un nivel de interferencia mínimo por parte de los pigmentos vegetales presentes en los extractos.

Las medidas de fluorescencia roja se realizarán a $\lambda_{ex}=543\text{nm}$; $\lambda_{em}=611\text{nm}$ para evaluar los niveles de acumulación de RE-RFP-2G3 presente en extractos de hojas de *N. benthamiana*.

ANEXO II

Análisis de secuencia de los factores de transcripción bZIPs utilizados.

Se realizó un análisis *in silico* de las secuencias de los tres factores de transcripción AtbZIP utilizados en este trabajo y del factor XBP1 de mamíferos. Este análisis se realizó utilizando las herramientas informáticas disponibles en www.uniprot.org y www.planttfdb.cbi.pku.edu.cn. Los resultados muestran secuencias características como señales de localización subcelular en el retículo endoplásmico y el núcleo, un dominio transmembrana que los ancla al RE y su dominio bZIP, conformado por la región básica de unión al ADN y la región de cremallera de leucinas.

El factor de transcripción bZIP60

El gen que codifica para el factor bZIP60 en *Arabidopsis thaliana*, AT1G42990 (GenBank Accession NM_103458), se encuentra en el cromosoma 1 y consta de 1741 pares de bases, de las cuales la región codificante solo tiene 888pb. El factor de transcripción bZIP60 consta de 295 aminoácidos. La señal de localización nuclear se encuentra a partir del aminoácido 141, señalada en **negrita y cursiva**, su dominio bZIP está comprendido entre los aminoácidos 141 y 183, **resaltado en gris**, y su dominio transmembrana que lo ancla a la membrana del retículo entre los aminoácidos 218 y 249, indicado con subrayado; quedando el extremo N-terminal de este factor hacia el lado citoplasmático.

1)	MAEEFGSIDLLGDEFFDFDPSIVIDLPAEDFLQSSPDSWIGEIENQLMNDENHQEESFVELDQQSVSDFIADLLVDYPTSDSGVSDLAADKVLTVDS
101)	PAAADDGKENSIDLVEKSNDSGSEIHDDDDDEEGDDDAVA KKRRRRVRNRDAAVRSRERKKEYVQDLEKKSXYLERECLRLGRMLECFVAENQSLRYCL
201)	QKGNNGNNTTMMKQESAVLLLESLLLGLSLLWLLGVNFICLFPYMSHTKCCLLRPEPEKLVNLGLGSSSKPSYTGVSRRCKGSRPRMKYQILTLAA-

El factor de transcripción bZIP17

El factor de transcripción bZIP17 de *Arabidopsis thaliana* utilizado en este trabajo es el homólogo de plantas del factor ATF6 descrito en animales. Este factor está codificado por el gen AT2G40950 (GenBank Accession: NM_129659) de 2992 pares de bases, ubicado en el cromosoma 2. El factor bZIP17 es una proteína de 721 aminoácidos, tiene dos señales de localización nuclear señaladas en **negrita y cursiva**, un dominio bZIP que se encuentra en la región 226-287, **resaltada en gris** y un dominio transmembrana en la región 365-389 (subrayado) que lo ancla a la membrana del retículo endoplasmático en situaciones normales. De esta manera, el extremo C-terminal queda hacia el lumen del RE y el N-terminal en el citoplasma, pudiendo migrar al núcleo cuando es activado en situaciones de estrés.

1)	MAEPIKTEQPPAPDPNSTYPPPSDFDISIPPLDDHFDSDQTPIGELMSDLGFPDGEFELTFDGMDDLYFPAENESFLIPINTSNQEFGDFTPESESS
101)	GISGDCIVPKDADKTIITSGCINRESPRDSDDRCSGADHNLDLPTPLSSQSGNGCGSDVSEATNESSPKSRNVAVDQKVKVEEAATTTTTSIT KR KKEIDE
201)	DLTDESRSKYRSGEDADASAVTGEED EKKRARLRMRNRESAQLSRQRKKHYVEELEEKVRNMHSTITDLNGKISYFMAENATLRQQ LGNGMCPPLP
301)	PPMGMYPPMAPMPYPWMPCCPPYMVKQGSQVPLIPIRLKPQNTLGTSKAKKSEKSEAKTKKY VASISFLGLLECLFLFGALAPIVNV NYGGISGAFYG
401)	NYRSNYITDQIYSQHRDRLDTSRSGAGTGVNSNGMHRGRSDRGARKNISATESSVTPGNGSEPLVASLFPVRNDKLVKIDGNLIINSILASEKAVAS
501)	RKASESKERKADLMISKDYTPALPLPDVGRTEELAKHLYRKAQKALSQSGSADTLKDQVKTAAANGEMQQWFREGVAGPMFSSGMCTEVFQFDVVSSTS
601)	GAIIPAATNVSAEHGKNTTDTHKQQRNRILRGLPIPLPGSDFNLTKHEHQNRSSSKEIKPASSMVVSVLVDPREGGDIDGMIGGPKLSRVFVVLLDS
701)	AKYVTYSCVLPRSGAPHLVTT-

El factor de transcripción bZIP28

El gen que codifica para el factor bZIP28 en *A. thaliana*, AT3G10800 (GenBank Accession: NM_111917), se encuentra en el cromosoma 3 y su región codificante consta de 2028pb. El factor bZIP28 es una proteína de 675 aminoácidos, al igual que el bZIP17, tiene dos señales de localización nuclear señaladas en **negrita y cursiva**, el dominio bZIP se encuentra en la región 187-252, **resaltada en gris** y un dominio transmembrana en la región 322-344 (subrayado) que lo ancla a la membrana del retículo endoplasmático. Al igual que el bZIP17, el extremo C-terminal queda hacia el lumen del RE y el N-terminal en el citoplasma, pudiendo migrar al núcleo cuando es activado en situaciones de estrés.

1)	MTESTSVVAPPPEIPNLNPSMFESDLFSIPPLDPLFLSDSDPISMDAPISDLDLDDENGDFADFDFFSFDNSDDFFDFDLSEPAVVIPEEIGNNRSNL
101)	DSEENRSGDGGLEGRSEVHSQVSSQGSKTFVSDTVDASSPESSNHQKSSVS KRKK ENGDSSGELRSCYQKSDDKSVATNNEGDD DDDKRKLIRQIRN
201)	RESAQLSRLRKKQTEELERKVKSMNATIAELNGKIAYVMAENVALRQQMAVASGAPPMNPYMAAPPLYQWMPYPYPVVRGYGSQTPLVPIKLNPKPV
301)	SSCRPKKAESKKNEGKSKLKKV <u>ASISFIGILFFVFLFGLVPPFM</u> NVNFGGERSFGGLSKYDGHRYYDEHKGRVLMVGDGSDVRRNSGISEGNIHSSRIS
401)	HGERDSCGGVDYNAHPKVEGRPSSLSNASDPLFASLYVPRNDGLVKIDGNLIHSVLASEKARGLGKKNITETVKTKEPDLTIPGALSSALAVPGVVRGNA
501)	AMLPHSTALSSEGKRLHQWFHEGGSGPLMDYSMCTEVFQFDIAPGAIVPSSVSSISAEHLQNVTTGKRMKNRRILEGLPVSLVASELNITGTQPNKDAQ
601)	NKTFNGNTNKPTSSSMVVSLLDPREVVDSETRVPPNPKLSRIFVVVLLDSVKYVTYSCVLRSGHLHVAT

ANEXO III

Estrategias de clonado y construcciones génicas

En el presente trabajo de tesis se evaluó el efecto de distintas moléculas involucradas en el desarrollo de la vía secretoria y/o plegado proteico sobre los niveles de acumulación de proteínas heterólogas en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Las construcciones de cDNA que codifican para algunos de los efectores utilizados en este trabajo, ya se encontraban disponibles en el laboratorio. Otras fueron realizadas a lo largo de mi trabajo de tesis doctoral. En la tabla A2 se resume la variedad de construcciones utilizadas.

Tabla A2: Resumen de las construcciones de cDNA de los efectores utilizadas.

Construcciones ya disponibles en el laboratorio				
Efactor	Abreviación	Accesion N°	Vector de entrada	Vector de destino
bZIP60ΔC	bZ60ΔC	AT1G42990	pENTR/D-TOPO	pEarley104
bZIP17	bZ17	AT2G40950	pENTR/D-TOPO	PGWB41
Construcciones realizadas en este trabajo				
Efactor	Abreviación	Accesion N°	Vector de entrada	Vector de destino
bZIP28ΔC	bZ28ΔC	AT3G10800	pENTR/D-TOPO	pEAQ-HT-DEST1
Calnexina 1	CNX1	AT5G61790	pENTR-SD-D-TOPO	pEAQ-HT-DEST1
Proteína 6 con dedo de Zn y tándem de CCCH*	PEI1	AT5G07500	pENTR221	pEAQ-HT-DEST1
Calreticulina 1B*	CRT1B	AT1G09210	pUNI51	pEAQ-HT-DEST1

*El clonado de estos efectores no resultó exitoso.

Estrategia de clonado llevada a cabo para las construcciones de cDNA realizadas en este trabajo.

Para el clonado de los efectores bZIP28ΔC, Calnexina1 y PEI1 se siguió la misma estrategia utilizada que para bZIP60ΔC y bZIP17, esquematizada en la figura A4. Esta estrategia, consistió en una reacción de recombinación sitio específica utilizando el sistema Gateway, donde el vector binario de destino fue siempre pEAQ-HT-DEST1. El sistema Gateway, permite un clonado direccional fácil y rápido, sin embargo, para aumentar la eficiencia del proceso, los plásmidos de entrada de cada uno de los efectores fueron digeridos con la enzima de restricción *MluI*, para luego purificar la banda que contiene al gen de interés. Dicho fragmento fue utilizado para la reacción de recombinación con el plásmido pEAQ-HT-DEST1. El producto de recombinación fue utilizado para transformar células competentes químicas de *E. coli* TOP10 según lo detallado en el punto 2.10 de Materiales y Métodos. Dichas células fueron crecidas en medio LB selectivo para Kanamicina y las colonias obtenidas se utilizaron para purificación de plásmido y chequeo de la construcción recombinante por corte con enzimas de restricción.

Los clones del bZIP28ΔC fueron chequeados por digestión con la enzima *XbaI* y *SacII* y los clones de la CNX1 fueron chequeados por digestión con *PstI* y *SacII*, dando los patrones de bandas correspondientes al clonado positivo. Los plásmidos recombinantes correspondientes fueron utilizados para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (punto 2.11 de Materiales y Métodos).

Sin embargo, para el caso de PEI1 se obtuvieron muy pocas colonias luego de la transformación con el producto de recombinación y el chequeo por digestión con las enzimas *NcoI* y *SacII* dio un patrón de bandas que se correspondía con el pEAQ-HT-DEST1 vacío. Por lo tanto el efector PEI1 no se incluyó en los ensayos posteriores de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.

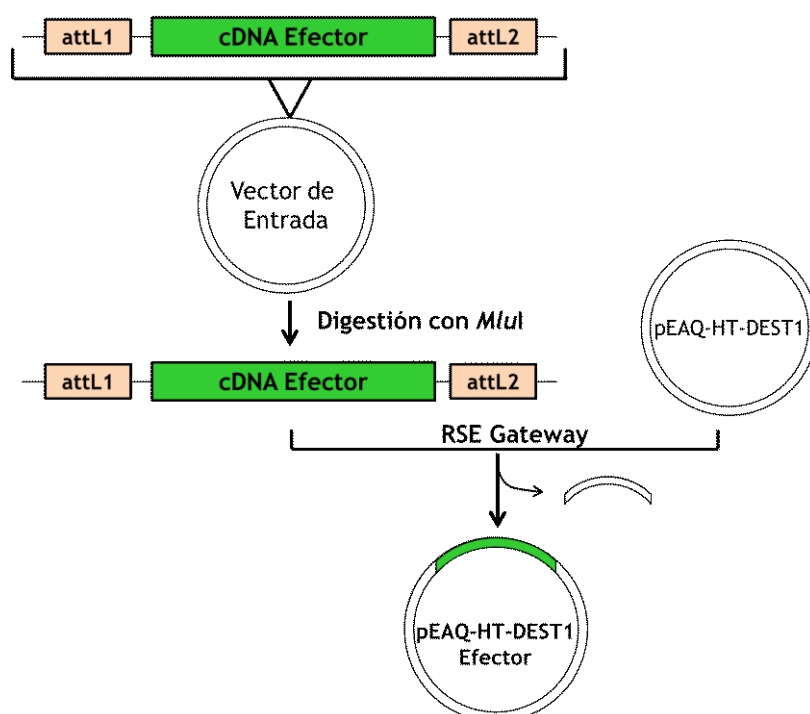


Figura A4: Esquema de la estrategia de clonado utilizada para los efectores bZIP28ΔC, CNX1 y PEI1. Se realizó una recombinación sitio específica (RSE) por el sistema Gateway entre el vector de destino pEAQ-HT-DEST1 y el fragmento correspondiente al gen de interés. Para aumentar la eficiencia del procedo, los vectores de entrada fueron previamente digeridos con la enzima de restricción *MluI*. Los vectores de entrada para cada construcción se detallan en la tabla A2.

Para el clonado de CRT1B desde el plásmido pUNI51 al vector binario pEAQ-HT-DEST1, se desarrollaron dos estrategias diferentes:

Estrategia 1:

La primera estrategia, consta de la inserción de una secuencia sintética (SecS), que contiene los sitios attL, y el subclonado del cDNA codificante para CRT1B en el plásmido pBlueScriptII-SK. Este plásmido será utilizado como vector de entrada para el posterior subclonado del gen de interés en el vector de destino pEAQ-HT-DEST1 por recombinación sitio específica utilizando el sistema Gateway. En la figura A5, se muestra un esquema general de la estrategia de clonado utilizada.

El primer paso de esta estrategia fue diseñar la SecS que contiene (figura A5):

- La secuencia de reconocimiento para las enzimas de restricción *KpnI* en el extremo 5' y *XhoI* en el extremo 3', que permitan subclonar la SecS en el plásmido pBlueScriptII-SK.
- Los sitios attL para la recombinación sitio específica por el sistema Gateway.
- La secuencia de reconocimiento para la enzima *SfiI* que permita el subclonado de la región codificante de CRT1B a la SecS.
- Una secuencia de relleno denominada ZZ.

El plásmido pBlueScriptII-SK y la secuencia sintética comercial fueron digeridos con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* según lo descrito en el punto 2.5 de Materiales y Métodos. Los fragmentos correspondientes a la SecS y el plásmido abierto, fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, purificados y ligados entre sí (puntos 2.3, 2.4 y 2.6 de Materiales y Métodos). El producto de ligación fue utilizado para transformar células competentes químicas de *E. coli* TOP10 o XL1-Blue. Estas células fueron luego crecidas en medio LB selectivo para Ampicilina y suplementado con IPTG y X-Gal para la selección blanco/azul por α -complementación que permite el plásmido pBlueScriptII-SK (punto 2.10 de Materiales y Métodos). Se seleccionaron algunas colonias blancas a partir de las cuales se purificó el plásmido recombinante y se digirió con *KpnI* y *XhoI* para el chequeo de los clones. Los clones positivos de esta primera etapa de clonado, fueron utilizados luego para el subclonado de la región codificante de CRT1B desde el plásmido pUNI51 utilizando la

enzima de restricción *SfiI*. Debido a que esta enzima es sensible a metilación, los plásmidos a digerir con *SfiI* fueron previamente utilizados para transformar células de *E. coli* JM110, deficientes en metilasas. El uso de la enzima *SfiI* fue exitoso para el plásmido pBluescriptII-SK con la secuencia sintética, lográndose liberar la secuencia de relleno ZZ del resto del plásmido. Sin embargo, no se logró escindir la región codificante de Calreticula1B desde el plásmido pUNI51, por lo que se procedió a intentar la estrategia de clonado 2.

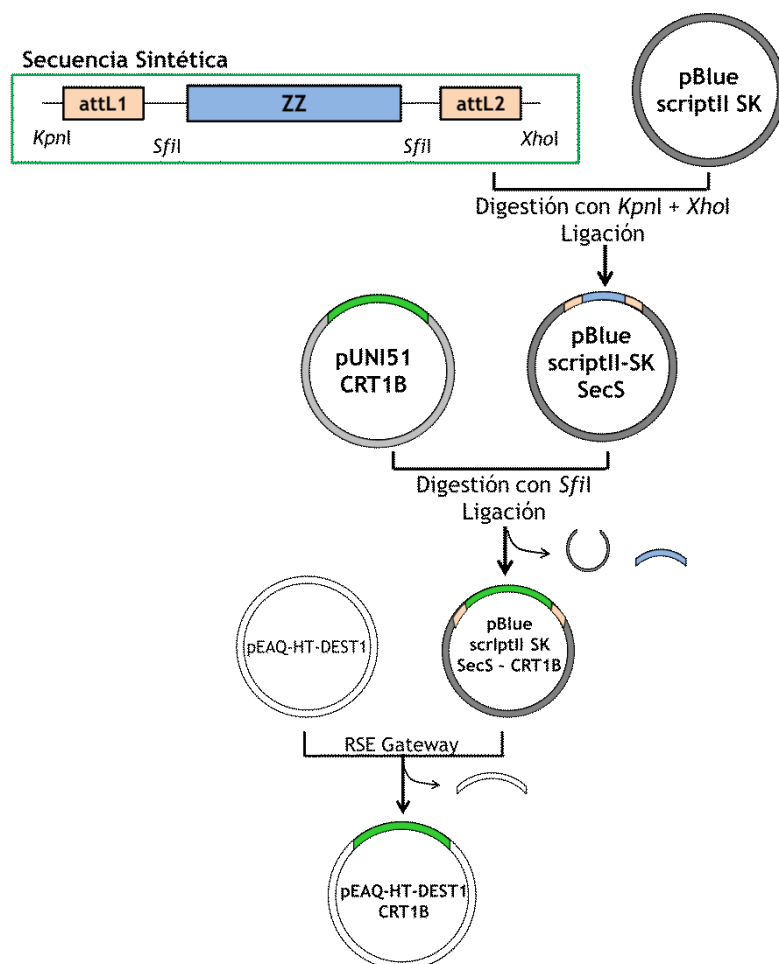


Figura A5: Esquema general de la estrategia de clonado 1 para CRT1B desde el plásmido pUNI51: En primer lugar se diseñó una secuencia sintética (SecS) que tuviera los sitios attL para recombinación sitio específica, una secuencia de relleno (ZZ) y sitios para distintas enzimas de restricción. La SecS fue subclonada en el plásmido pBluescriptII-SK utilizando las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI*. El producto de ligación, fue luego digerido con la enzima *SfiI*, al igual que el plásmido pUNI51 con el cDNA para CRT1B. De esta manera se logró subclonar el gen de interés en la SecS contenida en el plásmido pBluescriptII-SK. Finalmente se realizó una reacción de recombinación sitio específica (RSE) por el sistema Gateway para pasar el cDNA codificante para CRT1B al vector de destino pEAQ-HT-DEST1.

Estrategia 2:

La segunda estrategia consistió en la amplificación del cDNA correspondiente a CRT1B por PCR y posterior inserción del fragmento en el plásmido pCR[®]2.1-TOPO por reacción TOPO[®]TA. Luego, el fragmento correspondiente al cDNA de CRT1B sería subclonado al plásmido sintético pUC57-ZZ que es vector de entrada para realizar posteriormente una reacción de recombinación sitio específica por el sistema Gateway al vector de destino pEAQ-HT-DEST1.

El diseño de los cebadores, incluyó la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción *NcoI*, *KpnI* y *PfI* (tabla A3) que permitirían subclonar el cDNA de CRT1B con o sin la secuencia codificante de su péptido señal desde un plásmido TOPO al plásmido sintético pUC57-ZZ. Este plásmido contiene los sitios attL para recombinación sitio específica flanqueando un péptido señal secretorio (SP) seguido de una secuencia de relleno (ZZ). La digestión del plásmido con las enzimas *NcoI* y *PfI* permitiría la escisión de la secuencia SP junto con la secuencia ZZ, mientras que la digestión con *KpnI* y *PfI* solo removería la secuencia ZZ, dejando el SP del plásmido pUC57-ZZ. Finalmente, utilizando el sistema Gateway, el gen de interés sería subclonado en el vector binario pEAQ-HT-DEST1. En la figura A6 se muestra un esquema general de esta segunda estrategia de clonado y en la tabla A3 se detallan las secuencias de los cebadores diseñados para llevarla a cabo.

Tabla A3: Secuencias de cebadores diseñados para el clonado de la región codificante de Calreticulina1B.

Efactor	Cebador	Secuencia del cebador	EdR	Observaciones
CRT1B	CRT1BFwNcoI	TCCCATGGCGAAAATGATTCCTAGCCTC	NcoI	SP del GI
	CRT1BFwKpnI	GGTACCGCAGTTATTTTCGAGGAGC	KpnI	Sin SP
	CRT1BRvPflMI	TATCCACGCCGTGGTGAGCGGTGGCGTCTTTC	PflMI	Con stop

EdR= Enzima de Restricción; SP=Péptido señal; GI=gen de interés

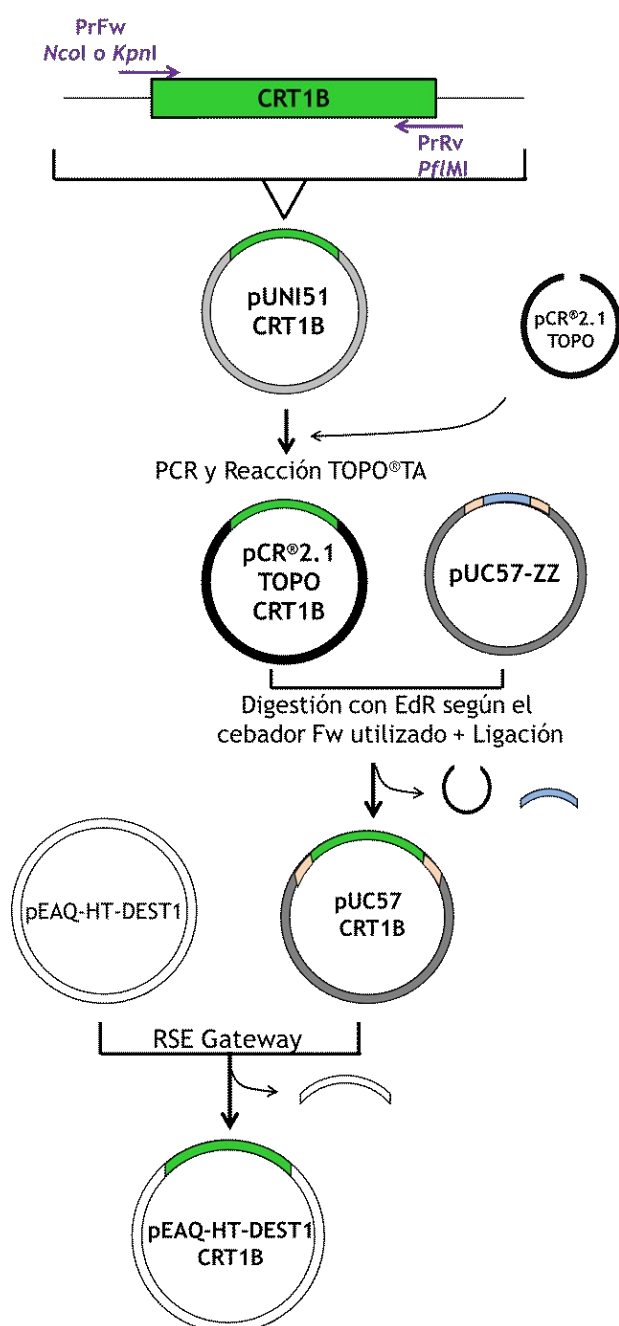


Figura A6: Esquema general de la estrategia de clonado 2 para CRT1B desde el plásmido pUNI51. Se diseñaron cebadores que amplifiquen el cDNA codificante para CRT1B con o sin su péptido señal y conteniendo las secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción como se detalla en la tabla A3. Los amplicones correspondientes a cada par de primers se insertaron en plásmido pCR^{2.1} TOPO por reacción TOPO[®]TA. Luego, el fragmento correspondiente al cDNA de CRT1B fue liberado utilizando las enzimas de restricción correspondientes según el par de cebadores utilizados en la PCR. Dicho fragmento fue subclonado en el plásmido sintético pUC57-ZZ(*) que es vector de entrada para la reacción de recombinación sitio específica por el sistema Gateway. A través de esta reacción el cDNA de CRT1B fue finalmente clonado en el vector de destino pEAQ-HT-DEST1.

*El plásmido sintético pUC57 contiene la secuencia de relleno ZZ representada en celeste y los sitios attL representados en naranja. EdR= enzima de restricción

En primer lugar, se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en gradiente de temperatura para estimar la temperatura óptima de hibridación de cada par de cebadores que fue de 58°C. Los fragmentos amplificados correspondientes a CRT1B sin y con su péptido señal fueron purificados desde un gel de agarosa y luego introducidos en el plásmido pCR^{2.1}-TOPO por reacción TOPO[®] TA. Los productos de esta reacción fueron utilizados para transformar células de *E. coli* TOP10 o XL1-Blue que fueron luego crecidas en medio LB selectivo para Kanamicina. Las colonias obtenidas se chequearon por PCR directa de colonias o previa purificación de plásmidos utilizando los cebadores correspondientes detallados en la tabla A3. Las reacciones de PCR fueron negativas

para todas las colonias. Debido a esta situación se reevaluó el diseño de esta estrategia y por una cuestión de tiempos, se decidió continuar el trabajo únicamente con los efectores cuyo clonado fue exitoso.