



UNIVERSIDAD NACIONAL de LA PLATA



Centro de Investigación y Desarrollo
en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)
CCT La Plata - CONICET

GONZALO R. ACEVEDO

**CONSTRUCCIÓN DE DISTINTAS FORMAS
MULTIMÉRICAS DE UN POLÍMERO SIMILAR A
ELASTINA (ELP) Y ESTUDIO DEL EFECTO
QUE EJERCEN EN LA ACUMULACIÓN DE
PROTEÍNAS FLUORESCENTES REPORTERAS
DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO**

Trabajo Final de Licenciatura en Biotecnología y Biología
Molecular

Directora: Dra. Silvana Petruccelli

RESUMEN

La fusión a polímeros similares a elastina (ELP) ha sido estudiada en los últimos años como estrategia para facilitar la recuperación de proteínas heterólogas de interés expresadas en distintos organismos. Trabajos previos indican que proteínas fusionadas a ELP se acumulan en cuerpos proteicos (PB) dentro del retículo endoplásmico (RE). El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de ELPs de distinta longitud (ELP1 $n=36$ y ELP2 $n=72$) sobre la acumulación de dos proteínas reporteras fluorescentes direccionadas a RE (GFP-ER y γ -RFP) a fin de evaluar si el stress generado por la presencia del ELP es capaz de activar mecanismos que mejoran la capacidad de la célula vegetal de sintetizar, plegar correctamente y transportar las proteínas reporteras. Para los ensayos se partió de la secuencia de ADN sintética de ELP₁ que contiene 36 repeticiones de secuencias (VPGXG) _{n} , donde X es cualquier aminoácido excepto prolina y n es el número de unidades repetitivas del pentapéptido. Esta secuencia fue dimerizada a través de una estrategia de multimerización recursiva para luego transferirse al vector binario pGWB2. La construcción resultante se transformó en un cultivo de la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* que fue utilizado para transformar por agroinfiltración hojas de *Nicotiana benthamiana*, junto con combinaciones del supresor del silenciamiento post-transcripcional p19 (proveniente del virus *Tomato Bushy Stunt Virus*, TBSV) y de los reporteros GFP-ER y γ Cherry. La cinética de la expresión transitoria fue evaluada mediante microscopio estereó de disección con filtros para fluorescencia analizándose el efecto de distintas cantidades reporteros, ELP y p19. Además por microscopía confocal se evaluó la formación de PBs. Se observó un patrón reticular en las células transformadas con p19 y el reportero, mientras que en presencia del ELP₂ se observó la presencia de PB móviles. Esto prueba que la sobreexpresión en *N. benthamiana* de ELP sintéticos direccionados al retículo endoplásmico (RE) capaz *per se* de producir un *stress* tal que modifique la acumulación de una proteína de interés aunque esta no se encuentre fusionada al ELP

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

°C	Grados centígrados
γCherry	Fusion génica entre la cadena pesada y del anticuerpo monoclonal 14D9 y la proteína fluorescente roja mCherry
μL	Microlitros
dpi	Días post-infiltración
ELP	Polímero similar a elastina
g	Unidad de aceleración centrífuga relativa a la aceleración de la gravedad
h	Horas
GFP	Proteína fluorescente verde
ITC	Ciclado de transición invertida
kg	Kilogramos
kpb	Kilopares de bases
mg	Miligramos
MI	Medio de infiltración
min	Minutos
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
p19	Supresor del PTGS del virus Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV)
pb	Pares de bases
PB	Cuerpos proteicos
PTGS	Silenciamiento génico posttranscripcional
RE	Retículo endoplásmico
t_e	Tiempo de extensión en una reacción de PCR
T_H	Temperatura de hibridación primer/molde en una reacción de PCR
T_m	Temperatura de disociación de una molécula de ADN
T_t	Temperatura de transición invertida de fase
U	Unidades de enzima, definidas en cada caso por el proveedor de la misma

ÍNDICE

Resumen	<i>i</i>
Abreviaturas utilizadas en el presente trabajo	<i>ii</i>
Índice.....	<i>iii</i>
I. Introducción.....	1
1. Las Plantas como Plataformas de Producción	1
1. <i>Breve reseña histórica.....</i>	<i>1</i>
2. <i>Ventajas de las plataformas de producción de proteínas basadas en plantas</i>	<i>2</i>
2. Estrategias para la producción de proteínas recombinantes en plantas.....	7
1. <i>Plataformas vegetales para la producción de proteínas recombinantes.....</i>	<i>7</i>
2. <i>Estrategias para la transformación genética de plantas</i>	<i>8</i>
3. <i>Procesamiento downstream.....</i>	<i>9</i>
3. Polímeros Similares a Elastina (ELP).....	11
1. <i>Definición y características</i>	<i>11</i>
2. <i>La purificación por Ciclado de Transición Invertida</i>	<i>11</i>
3. <i>ELPs y cuerpos proteicos</i>	<i>12</i>

II. Hipótesis y Objetivos	14
1. Hipótesis	14
2. Objetivos	14
III. Resultados y Discusiones	15
1. Diseño de Estrategia de Clonado.....	15
1. <i>Diseño del gen sintético ELP</i>	15
2. <i>Subclonado, Manipulación y Multimerización</i>	17
2. Construcción de los plásmidos que contienen los distintos ELPs.....	19
1. <i>Subclonado del gen sintético en el vector pCR8</i>	19
2. <i>Obtención del dímero ELP₂; Multimerización por Ligación Recursiva Direccional y por Reconstrucción Plasmídica</i>	19
3. <i>Obtención de la fusión génica SP-mCherry-ELP-His-KDEL</i>	25
4. <i>Transferencia a vector binario de expresión</i>	27
IV. Conclusiones y Perspectivas	35
1. Conclusiones	35
2. Perspectivas	36
V. Materiales y Métodos.....	37
1. Materiales	37
1. <i>Material biológico</i>	37
2. <i>Vectores Plasmídicos</i>	38
3. <i>Enzimas y kits enzimáticos</i>	38
4. <i>Oligonucleótidos</i>	38
5. <i>Medios de cultivo</i>	38
6. <i>Soluciones de antibióticos</i>	39
7. <i>Herramientas Bioinformáticas</i>	39
2. Métodos	39
1. <i>Técnicas de ADN recombinante</i>	39
2. <i>Microbiología</i>	41

3. <i>Expresión transitoria en plantas</i>	42
VI. Apéndice	44
Secuencia Nucleotídica Optimizada del Gen Sintético ELP ₁	44
Secuencia Aminoacídica Completa traducida desde el Gen Sintético ELP ₁	45
Secuencia Aminoacídica Completa traducida desde la construcción ELP ₂	45
VII. Bibliografía	46

I. INTRODUCCIÓN

1. Las Plantas como Plataformas de Producción

1. Breve reseña histórica

Históricamente, las plantas han sido utilizadas por la humanidad como fuente de diversos productos naturales: alimentos, materiales, medicinas, etc. Lejos de dejar esto de ser así, en las últimas décadas el devenir de nuevas tecnologías ha llevado a esta relación entre el hombre y las plantas a un nuevo plano: la aparición de los métodos para transformar genéticamente organismos vegetales superiores, que data de 1983 (Fraley y col., 1983), abrió un vasto abanico de nuevas posibilidades en la que se involucra a este tipo de organismos como plataforma productiva.

En un principio, la ingeniería genética de plantas solo se limitó a desplazar los límites de la tolerancia a *stresses* (insectos, salinidad, sequías, herbicidas, etc.) de cultivos ya tradicionales, con infraestructuras de producción ampliamente establecidas (Ahmad y col., 2011; Wilken y Nikolov, 2011). Sin embargo, años de desarrollo e

investigación en este campo y el incipiente, pero acelerado, inicio de inversiones de importancia en infraestructura para estos tipos de emprendimiento, han otorgado a la biotecnología de plantas relevancia creciente como estrategia de producción en los últimos años, ya no solo en el ámbito de la mejora de cultivos tradicionales sino en el desarrollo y producción de productos novedosos y más sofisticados. Pueden distinguirse, en este contexto, tres generaciones de “cultivares” genéticamente modificados (Ahmad y col., 2011):

- **Primera generación:** cultivos con resistencia mejorada a *stresses* ambientales (herbicidas, insectos, sequía, etc.)
- **Segunda generación:** cultivos alimenticios mejorados en su valor nutritivo, tanto directamente para consumo humano como para alimento para ganados;

- **Tercera generación:** cultivos destinados a la producción de bienes no típicamente asociados con la producción agrícola, tales como biocombustibles, biomateriales, fármacos, insumos de laboratorio, etc.

En el ámbito de la tercera generación de cultivares genéticamente modificados, los últimos años han sido de franco crecimiento a nivel comercial, primordialmente en el ámbito de la producción de moléculas de importancia clínica, diagnóstica y farmacéutica. En lo que a estos tipos de productos concierne, las plataformas basadas en plantas han logrado, en numerosos y variados casos, mejorar el rendimiento al disminuir los costos y mejorar la velocidad de producción, además de ofrecer otras ventajas que se discuten más adelante en este texto. La Tabla I.1 enumera algunos antígenos, proteínas terapéuticas, profilácticas y nutracéuticas que se producen en plantas y que se encuentran en distintas etapas de evaluación clínica y preclínica. Puede observarse el gran número de especies vegetales que resultan útiles en la producción, los distintos órganos empleados y variedad de moléculas: antígenos, anticuerpos, proteínas séricas, colágeno, enzimas, nutracéuticos, etc.

El mismo hecho queda en evidencia al considerar los eventos de importancia que han tenido lugar desde que esta rama de la biotecnología vegetal se inició en 1986, con la expresión de la primera proteína farmacéutica derivada de plantas: la hormona del crecimiento humana (Barta y col. 1986). Posteriormente, en 1989 se muestra el gran potencial de las plantas como “biofábricas”, al lograrse la producción del primer anticuerpo recombinante completo (por cruzamiento sexual de plantas que, por separado, producían las cadenas livianas y pesadas). Este anticuerpo monoclonal

murino se ensamblaba correctamente en hojas de tabaco (Hiatt y col. 1989).

Fueron necesarios más de 20 años para que los productos biofarmacéuticos derivados de plantas comenzaran a aparecer en el mercado. En este período se resolvieron algunos de los inconvenientes de esta plataforma y además se avanzó en estudios preclínicos y clínicos, así como en el diseño de plantas de producción siguiendo las normas de buenas prácticas de manufactura y de un marco regulatorio adecuado (Paul y Ma, 2011). Es de destacar que la FDA (*US Food and Drug Administration*) aprobó en mayo del 2012 el primer biofarmacéutico producido en plantas: glucocerebrosidase (Maxmen, 2012). Esta proteína empleada para tratar la enfermedad de Gaucher es producida en suspensiones de célula de zanahoria por Protalix Biotherapeutics y será comercializada por Pfizer (<http://www.protalix.com>).

El interés sobre las plataformas vegetales de producción en este ámbito viene impulsado por dos hechos principales: el crecimiento del mercado de los productos biofarmacéuticos y las dificultades intrínsecas de los sistemas ya establecidos, como por ejemplo los cultivos de líneas celulares humanas, levaduras y bacterias, que son costosos y poco eficientes. Ventajas adicionales de los sistemas basados en plantas se discuten en la próxima sección.

2. Ventajas de las plataformas de producción de proteínas basadas en plantas

A continuación se presenta un análisis comparativo de los distintos sistemas de producción de productos biofarmacéuticos, en el que se consideran los costos de inversión y producción,

Tabla I.1. Antígenos y proteínas terapéuticas producidos en plantas, en etapas de evaluación preclínica, clínica o posteriores. Adaptado de O.O. Obembe et al. (2011) y Ma et al. (2011).

Producto	Enfermedad/Aplicación	Planta	Estadio de pruebas clínicas	Compañía
Vacunas				
Antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg)	Hepatitis B	Lechuga	Fase I	Thomas Jefferson University (EE.UU.)
		Papa	Fase II	Arizona State University (EE.UU), Academia Nacional de Ciencias (Polonia)
Proteínas de fusión con epitopes de rabia (glicoproteína)	Rabia	Espinaca (vectores virales)	Fase I (completada)	Thomas Jefferson University (EE.UU.)
Vacuna contra el cáncer	Linfoma tipo no-Hodgkin	Tabaco	Fase II	Large Scale Biology (EE.UU.)
Subunidad de toxina de <i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Papa	Fase I	Arizona State University (EE.UU.)
Subunidad de toxina termolábil B de <i>Escherichia coli</i>	Diarrea	Maiz	Fase I	ProdiGene (EE.UU.)
		Papa	Fase I	Arizona State University (EE.UU.)
Proteína de cápside de virus Norwalk	Diarrea	Papa	Fase I	Arizona State University (EE.UU.)
Proteína de fusión con proteína de cápside de parvovirus	Parvovirus felino (perros)	Tabaco	Avanzado	Large Scale Biology (EE.UU.)
Virus TMV recombinante con epitopes de cápside de papilomavirus	Virus de papiloma cutáneo (conejos)	Tabaco	Inicial	Large Scale Biology (EE.UU.)
Proteína HN del virus de la enfermedad de Newcastle (Norovirus)	Enfermedad de Newcastle (aves de corral)	Células de tabaco en suspensión	Aprobado por el Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA)	Dow AgroSciences (EE.UU.)
Vacuna viral mixta	Enfermedades de caballos, perros y aves	Células de tabaco en suspensión	Fase I	Dow AgroSciences (EE.UU.)
Vacuna comestible para aves de corral	Coccidiosis	Canola	Fase II	Guardian Biosciences (Canadá)
Proteína de cápside de virus TGEV	Gastroenteritis (lechón)	Maiz	Fase I	ProdiGene (EE.UU.)
Candidato vacunal H5N1 (partícula similar viral)	Influenza pandémica H5N1	<i>Nicotiana benthamiana</i> (expresión transitoria)	Fase II	Medicago (EE.UU.)
Anticuerpos				
CaroRX	Caries dental	Tabaco	Aprobado en la U.E./ Fase II en EE.UU.	Planet Biotechnology (EE.UU.)
DoxoRX	Efectos colaterales de terapia contra el cáncer	Tabaco	Fase I (Completada)	Planet Biotechnology (EE.UU.)
RhinoRX	Resfrío común	Tabaco	Fase I (Completada)	Planet Biotechnology (EE.UU.)
Anticuerpos Fv (IgG anti-idiotipos varios) contra linfoma tipo no-Hodgkin	Linfoma tipo no-Hodgkin	<i>Nicotiana benthamiana</i> (expresión transitoria)	Fase I	Large Scale Biology (EE.UU.), Bayer Innovation (Alemania)

Producto	Enfermedad/Aplicación	Planta	Estadio de pruebas clínicas	Compañía
Anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD20	Linfoma tipo no-Hodgkin	<i>Lemna sp.</i>	Fase preclínica	Biolex (EE.UU.)
IgG (ICAM1)	Resfrío común	Tabaco	Fase I	Planet Biotechnology (EE.UU.)
Anticuerpos anti-Hepatitis B	Purificación de vacunas	Tabaco	En el mercado	CIGB (Cuba)
Anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral (Pr-anti-TNF)	Artritis	Células de zanahoria en suspensión	Fase I	Protalix Biotherapeutics (Israel)
IgG 2G12	VIH (profilaxis)	Tabaco	Fase I	Consortio Pharma-Planta (consorcio Europeo-Sudafricano)
Proteínas humanas de uso terapéutico				
Lipasa gástrica, Merispase®	Fibrosis quística	Maíz	En el mercado	Meristem Therapeutics (Francia)
α-galactosidasa	Enfermedad de Fabry	Tabaco	Fase I	Planet Biotechnology (EE.UU.)
Interferón α modificado (Lactoferon™)	Hepatitis B y C	<i>Lemna sp.</i>	Fase II	Biolex (EE.UU.)
Plasmina recombinante	Trombosis. Aplicación en profilaxis.	<i>Lemna sp.</i>	Fase I	Biolex (EE.UU.)
Glucocerebrosidasa humana (prGCD)	Mal de Gaucher	Células de zanahoria en suspensión	A espera de aprobación del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA)	Protalix Biotherapeutics (Israel)
Insulina	Diabetes	Cártamo	Fase III	SemBioSys, Canadá
Apolipoproteína Apo-A1 ^{Milano}	Enfermedades cardiovasculares	Cártamo	Fase I	SemBioSys, Canadá
Colágeno	Aplicación en cirugía reconstructiva, como proteína estructural	Maíz	Fase preclínica	Meristem Therapeutics (Francia)
	Aplicación como enzima terapéutica en fibrosis quística y pancreatitis	Maíz	Fase II	Meristem Therapeutics (Francia)
Acetilcolinesterasa	Defensa frente a agentes neuroactivos / profilaxis	Células de zanahoria en suspensión	Fase I	Protalix Biotherapeutics (Israel)
β-glucosidasa	Mal de Gaucher	Semillas de tabaco	Fase preclínica	Plantechno SRL (Italia)
Seroalbúmina humana	Aplicación en la homeostasis de la presión del plasma sanguíneo	Lino	Fase preclínica	Agragen (EE.UU.)
Nutracéuticos				
ISOkiné™, DERMOKiné™	Deficiencias de factores de crecimiento humanos	Cebada	En el mercado	ORF Genetics (Islandia)
Factor intrínseco humano, Coban	Deficiencia de vitamina B12	<i>Arabidopsis</i>	En el mercado	Cobento Biotech AS (Dinamarca)
Lactoferrina humana	Infecciones gastrointestinales infantiles	Arroz	Avanzado, venta en el mercado como reactivo	Ventria (EE.UU.)
Lisozima humana	Infecciones gastrointestinales infantiles	Arroz	Avanzado, venta en el mercado como reactivo	Ventria (EE.UU.)
Inmunosphere™	Aditivo alimentario para camarones	Cártamo	Comercialización proyectada para 2010	SemBioSys (Canadá)

tiempo de escalado, riesgos y preocupaciones éticas, y propiedades del producto obtenido.

i. Costos y escalado

Como se señaló anteriormente, el interés en las plantas como productoras de proteínas recombinantes se debe en buena medida a los problemas asociados con los biorreactores más tradicionales. Los sistemas basados en células de mamíferos son extremadamente costosos y no pueden escalarse con facilidad. En contraste, los sistemas bacterianos y de levaduras han sido llevados a escala industrial desde hace ya tiempo, y su costo es notoriamente menor que el de los anteriores. Sin embargo, por razones que se discutirán más adelante, la calidad de los productos que pueden fabricarse en estos reactores es un factor limitante. Además estos sistemas no son adecuados cuando se requiere una producción de toneladas de proteína purificada por año, como es el caso de muchos biofarmacéuticos (anticuerpos monoclonales y hemoderivados)

La producción en plantas permite un escalado relativamente fácil, en el que en términos generales sólo se necesita incrementar el área cultivada para aumentar la escala de producción. Dependiendo de la proteína de interés esta deberá purificarse, o bien el material vegetal podrá emplearse directamente en industria como por ejemplo en el caso de enzimas con aplicaciones industriales (como en los casos de producción de papel, biocombustibles, etc.) o el uso directo del producto para consumo humano o animal (Ahmad y col., 2011). La facilidad con que puede realizarse el proceso inverso, es decir el escalado hacia abajo (“*scale-down*”), también es interesante, ya que es una versatilidad no presente en otros sistemas de producción donde el costo de las instalaciones empleadas en el proceso *upstream* es alto. .

Se estima que el costo de producción de proteínas recombinantes en plantas es del 2-10% del costo de la misma producción en fermentadores microbianos y un 0,1% del de cultivos de células animales, pudiendo estos valores variar dependiendo del rendimiento en producto (Twyman y col., 2003). Un cálculo aproximado indica que con una acumulación de 1% P/PS (peso seco) en en maíz y con una recuperación del 50% de la proteína durante la purificación, el costo de la producción en plantas es entre 10 a 50 veces inferior que en un sistema microbiano y hasta 1000 veces menor que en un sistema de células animales en cultivo (Xu y col., 2011).

Sin embargo, el análisis del factor económico en la producción vegetal de proteínas es materia compleja, puesto que el costo real de una de estas plataformas vendrá impuesto por diversos factores a considerar en cada caso particular, entre los cuales pueden indicarse los costos del cultivo de las plantas, del procesamiento y transporte del material y de la recuperación y purificación de la proteína de interés (Ahmad y col., 2011).

Es interesante destacar, en el contexto de este trabajo, que ésta última variable es en la mayoría de los casos el principal componente del costo total de producción, representando en promedio alrededor de un 80% del mismo cuando se trata de proteínas recombinantes expresadas en plantas (Obembe y col., 2011), oscilando entre el 65 y el 90% (Wilken y Nikolov, 2011) en función de la concentración de la proteína de interés, la complejidad del extracto primario y el grado de purificación requerido.

ii. Bioseguridad

Una de las principales ventajas del uso de sistemas vegetales de producción es que pueden considerarse libres de patógenos que afecten a la salud humana, a diferencia de los cultivos de células animales y los animales transgénicos (que

pueden infectarse con virus y priones) y de los sistemas bacterianos (cuyo principal riesgo asociado son las toxinas) (Spök y col., 2008).

No obstante, debe tenerse en cuenta que, cuando se opta por una estrategia de transformación que involucre el uso de *Agrobacterium sp.*, existe la posibilidad de introducir contaminación por endotoxinas bacterianas en conjunto con aquella, lo cual puede llegar a significar la necesidad de un mayor grado de refinamiento en el procesamiento *downstream*, así como en el control de calidad en cuanto a este riesgo, en pro de cumplimentar con las buenas prácticas de manufactura actuales (Paul y Ma, 2011).

iii. Complejidad de los productos

En muchas ocasiones, la proteína que se busca producir requiere condiciones especiales de plegamiento y/o modificaciones post-traduccionales que las bacterias son incapaces de llevar a cabo. Incluso las levaduras, a pesar de su condición de organismos eucariotas, a menudo son incapaces de realizar tales procesamientos del modo en que se requieren. En definitiva, en estos casos, aunque la proteína pueda producirse en buenas cantidades en un fermentador microbiano, es altamente probable que ésta no sea funcional debido a plegamientos “incorrectos” o a la carencia de alguna modificación post-traducciona. (Ahmad y col., 2011)

Es así que cuando se desea expresar proteínas de estructura compleja que los sistemas microbianos son incapaces de manejar, las plantas son la mejor alternativa.. Las vías de plegamiento y modificación de las proteínas están esencialmente conservadas entre plantas y animales, difiriendo en las modificaciones que ocurren desde el complejo de Golgi medio en adelante.. Cabe destacar que ambos tipos de organismos tienen una organización compleja, con tejidos y órganos altamente

especializados, y que poseen diferencias a nivel celular que responden a su propia fisiología. Estas diferencias pueden aprovecharse en beneficio de los objetivos de la producción, por ejemplo, eligiendo producir la proteína recombinante en un tejido especializado en secreción o en almacenamiento a largo plazo.

Al igual que los animales, las plantas poseen una vía secretoria para la síntesis de proteínas que involucra al sistema interno de membranas de la célula. Dentro de ésta vía ocurren las modificaciones por glicosilación, más específicamente, en el interior del retículo endoplásmico (RE) y del aparato de Golgi. El fenómeno de glicosilación es crucial para el correcto plegamiento, la solubilidad, la actividad biológica y la biodisponibilidad de un gran número de proteínas. Sin embargo, los patrones de glicanos que las plantas incorporan en sus proteínas son diferentes de los de los mamíferos. Este ha sido uno de los desafíos mayores con que se ha encontrado la producción de proteínas recombinantes en planta destinadas a cierto conjunto de usos (téngase en cuenta, sin embargo, que los patrones de N-glicanos de levaduras difieren muchísimo más de los de animales que los de plantas, mientras que las bacterias no son capaces de incorporar ningún tipo de N-glicano a sus proteínas) (Spök y col., 2008).

En consecuencia de esto, un número diverso de estrategias ha sido desarrollado para superar este inconveniente. Una de ellas es la retención de la proteína en el RE mediante la adición de secuencias C-terminales, tales como KDEL, lo cual restringe el tipo de glicosilaciones que ésta puede sufrir, al impedirle avanzar más allá en la vía secretoria (Floss y col., 2009). Otras incluyen desde *knock-outs* génicos que impiden la incorporación de ciertos motivos de N-glicanos complejos en las glicoproteínas (Koprivova y col.,

2004) hasta el *knock-in* de la vía de síntesis e incorporación de ácido siálico, propia de los mamíferos, al genoma de la planta (Castilho y col., 2010). La glicoingeniería de proteínas producidas en plantas es aún un blanco muy activo en el objetivo de mejorar la calidad de los vegetales superiores como productores eficientes de proteínas sofisticadas.

iv. Estabilidad y acumulación de los productos

Años de investigación han demostrado que la estabilidad de las proteínas recombinantes en plantas puede potenciarse mediante el uso de direccionamiento hacia compartimientos subcelulares determinados. Por ejemplo, se sabe que, en general, la estabilidad de una proteína recombinante es hasta 100 veces mayor en el espacio apoplástico de la pared celular respecto de en el citosol. Se ha informado, además, que la inactivación de proteasas del apoplasto constituye una estrategia que incrementa la estabilidad de proteínas recombinantes (Benchabane y col., 2008; Goulet y col., 2012). Para algunas proteínas, la estabilidad puede aumentarse aún más si se las retiene en alguna división membranosa en particular, como por ejemplo el RE, el aparato de Golgi o la vacuola (Obembe y col., 2011). Estas posibilidades se ven fuertemente limitadas o anuladas en otro tipo de sistemas productivos.

Además, como ya se señaló anteriormente, las plantas a menudo tienen estructuras especializadas en la acumulación de proteínas que pueden aprovecharse a favor de la estabilidad y el almacenamiento del producto, como es el caso de las semillas oleaginosas, por ejemplo. En la naturaleza, las proteínas de almacenamiento suelen acumularse en organelas especializadas, como son las vacuolas de almacenamiento de proteínas (*PSV*, por *protein storage vacuole*) en el embrión y el endosperma, y en cuerpos proteicos (*PB*, por *protein bodies*), directamente ensamblados con el RE en otros tejidos (Herman y Larkins, 1999).

Para la mayoría de los organismos eucariotas, la acumulación exacerbada de proteínas (en general, de notable porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos) en el RE induce dos tipos de respuestas a *stress* reticular, que desatan una cadena de eventos culminando en la degradación de esas proteínas. Sin embargo, las plantas se presentan como una excepción -al menos parcial- en la que en lugar de degradarse, la proteína en cuestión a menudo se acumula en PBs, como consecuencia de la activación de un número de factores génicos (Herman y Larkins, 1999).

2. Estrategias para la producción de proteínas recombinantes en plantas

1. Plataformas vegetales para la producción de proteínas recombinantes

Durante los últimos veinte años se ha desarrollado una variedad de sistemas vegetales capaces de ser utilizados en la

producción de proteínas recombinantes. Todos ellos pueden categorizarse en:

- Sistemas basados en **semillas**;
- Sistemas basados en **hojas** y otros tejidos vegetativos;
- Sistemas basados en **biorreactores**.

Las características de cada grupo se resumen en la Tabla I.2.

	<i>Nicotiana sp. a campo abierto</i>	<i>Nicotiana sp. en invernadero</i>	Rizosecreción	Expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i>	Cultivos celulares
Producto típico o modelo	Anticuerpos, antígenos	Anticuerpos, antígenos	Proteínas pequeñas, anticuerpos	Anticuerpos, antígenos	Vacunas de uso veterinario, glucocerebrosidasa
Rendimiento	●●	●●	●	●●●	●●●
(rango)	(15-50 mg/kg hoja fresca)	(15-50 mg/kg hoja fresca)	(0,25-3 µg/mL/día)	(0,5-4 g/kg hoja fresca)	
Escalabilidad	●●●	●	●●	●●	●
Consistencia	●	●●	●●	●●	●●●
Complejidad de la purificación downstream	●	●	●●●	●	●●
Desarrollo a nivel regulatorio	●	●●	●●	●	●●●

Tabla 1.2. Comparación de estrategias para la producción de proteínas heterólogas en sistemas vegetales. (Adaptado de Ma y col. (2011))

De todos ellos, se seleccionó para este trabajo un sistema basado en hoja, teniendo en cuenta dos grandes virtudes que se les atribuyen: el alto rendimiento en biomasa (que a menudo se refleja en un alto rendimiento en la proteína de interés) y la relativa facilidad para la extracción proteica que ofrecen (Wilken y Nikolov, 2011; Xu y col., 2011).

2. Estrategias para la transformación genética de plantas

Desde la perspectiva de la modificación genética de plantas, podemos diferenciar dos enfoques principales (Obembe y col., 2011):

- el de la **expresión estable**, que implica la incorporación del material genético exógeno al genoma de la planta – ya sea al nuclear o alternativamente al plastídico– lo que significa que la modificación introducida es permanente para la planta (está presente a nivel genómico en todos los tejidos) y heredable a su descendencia;

- el de la **expresión transitoria (o temporal)**, en el cual la información genética es introducida en un conjunto de células (en general, de un tejido vegetativo), de modo que el cambio afecta solamente a esas células y no es heredable a la progenie de la planta. Esta última estrategia ha sufrido grandes mejoras con el empleo de replicones virales (Marillonnet y col., 2005; Giritich y col., 2006; Whaley y col., 2011).

Dependiendo de la proteína de interés es la estrategia más conveniente. Así, la primera es ampliamente utilizada, por ejemplo, para la acumulación de proteínas en semillas para almacenamiento a largo plazo y proporciona una elevada capacidad para el escalado de la producción. Sin embargo tiene la desventaja de la normativa que regula el cultivo de OGM (organismos genéticamente modificados) que exige un gran número de estudios que conllevan a muchos años de demora (Twyman y col., 2005; Spök, 2007). La expresión temporal se elige cuando se requieren grandes cantidades de proteína en tiempos cortos. Consecuentemente, éste último sistema es el de elección cuando se trata de poner

a prueba la expresión de constructos génicos y de validar la actividad de proteínas recombinantes nuevas (Xu y col., 2011). Suele optarse por esta estrategia cuando se desea hacer vacunas personalizadas o bien contra patógenos cuya estructura varía rápidamente por su veloz escalabilidad (Huang y col., 2005; D'Aoust y col., 2010; Phoolcharoen y col., 2012; Shoji y col., 2012)

Uno de los métodos de expresión transitoria más fácilmente aplicables y más ampliamente utilizados es el de **agroinfiltración**, consistente en aplicar sobre tejido foliar, mediante presión o vacío, una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* recombinante, portadora del material genético de interés y la maquinaria necesaria para su transferencia a la célula vegetal. Desde su invención por Kapila y col. en 1997, la aplicación de esta técnica ha sido documentada y perfeccionada para un número finito de plantas (entre las cuales podemos encontrar, entre otras, a *Nicotiana benthamiana*), hasta devenir en una aproximación muy rápida y de buen rendimiento para la expresión transitoria de proteínas recombinantes en plantas (Obembe y col., 2011). Además, permite la co-expresión de varios genes en simultáneo, de manera relativamente sencilla (Xu y col., 2011), una posibilidad de crucial importancia para el desarrollo de este estudio.

Con base en estas consideraciones, se optó para el presente trabajo por aplicar una estrategia de expresión transitoria mediante agroinfiltración en *Nicotiana benthamiana*.

3. Procesamiento *downstream*

Como se mencionó con anterioridad, el procesamiento *downstream*, entendido como el conjunto de los procedimientos que se aplican a la muestra desde su

conversión en el extracto crudo hasta la obtención de la proteína en el grado de pureza deseado, representa un muy alto porcentaje del costo total en la producción de proteínas recombinantes en plantas. En consecuencia, es un asunto que ha recibido atención considerable en lo que respecta a la investigación y desarrollo necesario (Obembe y col., 2011).

La eficiencia total del procesamiento *downstream* está afectada por la concentración de la proteína en el extracto, la complejidad de éste último y el grado de purificación final requerido (Wilken y Nikolov, 2011). El esquema general del procesamiento *downstream* para proteínas recombinantes en plantas se ilustra en la Figura #FIGURA I.1.

Según Wilken y Nikolov (2012), se puede separar esta fase en dos etapas: la **recuperación primaria**, cuya finalidad es maximizar el título del producto al mismo tiempo que se reduce el volumen de extracto o de medio, y generar una alimentación más limpia que el homogenado inicial para la etapa siguiente, la **purificación (Wilken y Nikolov, 2012)**.

Para un sistema basado en tejido foliar, la recuperación primaria consta de los siguientes pasos generales: (1) formación del homogenado o extracto acuoso para liberar al producto de la biomasa; (2) separación sólido/líquido y (3) acondicionamiento, pretratamiento y clarificación. La optimización de la recuperación primaria no puede ser generalizada más allá de estos pasos, y debe afrontarse según las peculiaridades de cada caso particular.

La etapa de purificación suele comenzar con un paso de captura, que sirve fundamentalmente para eliminar las impurezas más groseras. En general, la purificación de proteínas recombinantes solía depender, hasta hace poco tiempo, de la cromatografía de

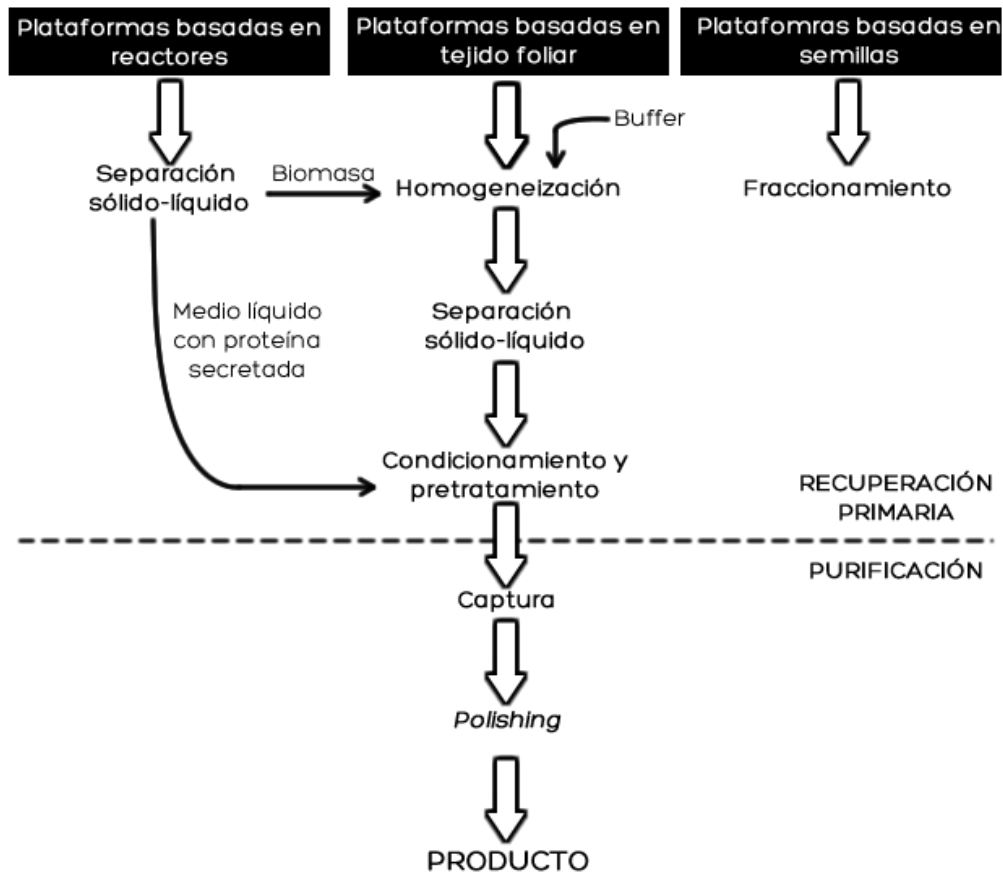


Fig. 1.1. Esquema general de los pasos que componen el procesamiento *downstream* a partir de distintas plataformas de expresión vegetal. (Adaptado de Wilken y col., 2011)

adsorción, dados su versatilidad y poder de resolución (Wilken y Nikolov, 2011). Sin embargo, un número de publicaciones recientes desvían la atención hacia métodos alternativos, algunos de los cuáles se muestran prometedores

respecto a los rendimientos que permite y a sus capacidades de escalado.

Una de las aproximaciones que mejores resultados ha conseguido hasta la fecha, y que concierne al presente trabajo, es el uso de etiquetas o “*tags*”, secuencias aminoacídicas que se fusionan mediante ingeniería genética a la proteína de interés para permitir su recuperación mediante métodos particulares. En una cantidad de casos, estos “compañeros de fusión” han demostrado cumplir la función extra de estabilizar la proteína, protegiéndola de la proteólisis en el

ámbito celular (Streatfield, 2007; Wilken y Nikolov, 2011).

Entre los *tags* más ampliamente adoptados en un principio, estuvieron los de afinidad, entre los que puede encontrarse a His₆ (también llamado His-tag), que permite la utilización de columnas de cromatografía de afinidad de Ni⁺ o Co⁺ para separar la proteína de interés del resto del extracto. Sin embargo, la utilización de *tags* de afinidad para la purificación de proteínas es solamente conveniente a escala de laboratorio, pues trasladarlo al uso industrial resultaría en costos excesivos (respondiendo tanto al valor comercial de las resinas de afinidad y demás equipamiento necesario como al requerimiento de un mayor grado de refinamiento previo del extracto) (Lim y col., 2007; Wilken y Nikolov, 2011).

Desde mediados de los años '90s, se han estado desarrollando un conjunto de métodos alternativos con el objeto de eliminar la cromatografía de afinidad como paso necesario, de manera de superar este obstáculo en el escalado hacia niveles de producción mayores. Un ejemplo de esto es tecnología de fusión a oleosinas desarrollada por SemBioSys™, que permite la extracción de la fusión proteína de interés-oleosina por medio de un paso simple de extracción por sistema de dos fases.(Twyman y col., 2003).

Una estrategia novedosa es la propuesta por D. Meyer y A. Chilkoti, que formula la utilización de fusión a polímeros similares a elastina (ELP) de la proteína de interés para permitir su recuperación mediante una metodología sencilla y económicamente conveniente (Meyer y Chilkoti, 1999; Lim y col., 2007). Las características de este sistema se discuten en la próxima sección.

3. Polímeros Similares a Elastina (ELP)

1. Definición y características

Los polímeros similares a elastina (ELP, por *Elastin-Like Polymers* o también *Elastin-Like Polypeptides*) son biopolímeros sintéticos derivados de la repetición de cinco aminoácidos que compone la elastina: Val-Pro-Gly-Val-Gly que se caracterizan por sufrir lo que se denomina una **transición de fase invertida**: por debajo de su temperatura de transición (T_t), estos polipéptidos son altamente solubles, mientras que cuando la temperatura se aumenta por encima de T_t , ocurre un cambio de estructura tridimensional tal que sus cadenas laterales hidrofóbicas quedan más expuestas hacia la superficie, ocasionando el agregado por colapso hidrofóbico de los ELP y su precipitación para formar una nueva fase, enriquecida en el polímero. Esta transición es **reversible**, lo que significa que el enfriado de la solución resulta en la re-solubilización del polipéptido (Meyer y Chilkoti, 1999; Meyer y Chilkoti, 2002a).

Adicionalmente, la transición invertida de fase de un ELP puede dispararse isotérmicamente al adicionar sales al medio en que se encuentra disuelto (Lim y col., 2007).

Tal como se describe en Lim y col. (2007), la T_t de un ELP depende de los siguientes factores:

- La fuerza iónica del medio;
- La composición de su secuencia aminoacídica (ver más adelante);
- La cantidad de repeticiones del pentapéptido;
- La identidad de su “compañero de fusión”, si lo hubiera, y en particular de su carácter hidrofóbico;
- La posición relativa del anterior.

El conjunto de las características de los ELP ha llevado al desarrollo de una estrategia de purificación de proteínas recombinantes a partir de diversos materiales biológicos, por un método no cromatográfico denominado **purificación por ciclado de transición invertida** (ITC, por *Inverse Transition Cycling*) (Meyer y Chilkoti, 1997), que se discute a continuación.

2. La purificación por Ciclado de Transición Invertida

Esta técnica se basa en las propiedades enumeradas de los ELP y

utiliza estrategias de fusión génica para recuperar proteínas recombinantes de interés a partir de muestras complejas, como por ejemplo, extractos clarificados de bacterias (Trabicc-carlson y col., 2004; Lim y col., 2007) o extractos acuosos de tejido vegetal (Scheller y col., 2006; Floss y col., 2009).

El método puede perfeccionarse para cada caso particular al optimizar las condiciones en las que ocurre la transición de fase invertida de la proteína de fusión. Hay tres variables de las cinco que afectan a la T_t de un ELP que pueden modificarse desde la ingeniería genética en pos de esto.

Una de ellas es la composición aminoacídica del ELP. En realidad, hay toda una familia de polímeros utilizados como “compañeros de fusión” para aplicar en purificación por ITC. Todos tienen en común que son repeticiones del pentapéptido Val-Pro-Gly-Xaa-Gly, donde Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto Prolina. El variar la identidad de éste último aminoácido, se puede modular la T_t del ELP (y consiguientemente, de sus fusiones con otras proteínas). Incluso, al no necesitar Xaa ser el mismo en todas las repeticiones del polímero, la T_t puede regularse ensayándose diversas relaciones de distintos Xaa en el polipéptido total. De esta forma, por ejemplo, un ELP de 36 repeticiones pentapeptídicas en el que la composición del Xaa sigue una relación [1 Lys : 7 Val : 1 Phe] tiene una T_t de 48,0 °C en *buffer* 25 μ M PBS, mientras que uno de 32 repeticiones de pentapéptidos y de composición del Xaa en relaciones [1 Lys : 2 Val : 1 Phe] tiene una T_t de >90 °C en el mismo *buffer* (Lim y col., 2007).

Otra variable en cuestión es la cantidad de repeticiones del pentapéptido. En general se observa que cuanto mayor es esta cantidad, menor es la T_t que exhiben. Por ejemplo, un péptido de composición de Xaa [1 Lys : 7 Val : 1 Phe]

de 18 pentapéptidos tiene una T_t en *buffer* 25 μ M PBS de 73,1 °C, mientras que uno de 144 repeticiones, de la misma composición de Xaa, en el mismo *buffer* tiene una T_t de 28,4 °C (Lim y col., 2007). Esto, sin embargo, plantea una relación de compromiso: si bien, hasta cierto punto, un mayor número de repeticiones permitiría una separación más fácil de la proteína de interés (disparando la transición a menor temperatura y/o menor agregado de sales), las proteínas de gran tamaño se expresan con una eficiencia mucho menor en cualquier sistema biológico. Por ende, este factor debe analizarse cuidadosamente a la hora de diseñar un ELP para utilizarse en una recuperación por ITC.

La tercera y última de estas variables es la posición del ELP en la fusión, respecto de la proteína de interés. Se ha reportado, ensayándose un conjunto de proteínas de interés de naturalezas diversas, que la fusión proteína de interés-ELP se expresa en mayores cantidades que la fusión ELP-proteína de interés y que, en la mayoría de los casos, la fusión con el ELP en el C-terminal tiene mayor actividad de la proteína de interés que la fusión con el ELP en el N-terminal (Christensen y col., 2009).

3. ELPs y cuerpos proteicos

Además de permitir la purificación fácil y económica mediante ITC, se ha reportado en algunos casos que la fusión con ELP produce además mayores niveles de acumulación de la proteína de interés (Scheller y col., 2006; Floss y col., 2009; Floss y col., 2010).

Investigación posterior sobre el mecanismo en que este incremento es provocado han llevado a resultados que indican que, cuando se dirige la proteína de fusión a retículo endoplásmico, el ELP actúa induciendo la formación de cuerpos proteicos (PB) en el mismo. Estos PB son

altamente móviles y se desplazan utilizando el sistema de movilidad por actomiosina de la célula vegetal (Conley y col., 2009b).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

Con base en la información expuesta en la introducción precedente, se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

- La sobreexpresión en *N. benthamiana* de ELP sintéticos direccionados al retículo endoplásmico (RE) sería capaz *per se* de producir un *stress* tal que modifique la acumulación de una proteína de interés aunque esta no se encuentre fusionada al ELP

- El ELP VG-(VPGVG)₃₂-(VPGFG)₄-GVPGW, cuya alta eficiencia en la recuperación de proteínas de interés por ciclado de transición invertida (ITC) fue ya demostrada en bacterias, sería igualmente eficaz para recuperar proteínas producidas en sistemas vegetales.

2. Objetivos

En respuesta a las hipótesis planteadas, se proponen los siguientes objetivos específicos para el desarrollo del trabajo:

- Diseñar una estrategia de multimerización y fusión génicas que permitan generar multímeros de ELP de distintos tamaños y fusionarlos a diferentes proteínas de interés con facilidad.

- Obtener estas construcciones multiméricas y subclonaras en vectores de expresión en células vegetales

- Analizar la funcionalidad de estas construcciones por expresión transitoria en *N. benthamiana* y evaluar su impacto en la acumulación de proteínas reporteras y en la estructura del RE por microscopía confocal.

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Diseño de Estrategia de Clonado

1. Diseño del gen sintético ELP

Como se mencionara oportunamente en la introducción, las propiedades fisicoquímicas de un determinado ELP dependen fuertemente de su secuencia (esto es, de la longitud y la composición aminoacídica del polipéptido). Para el diseño de la secuencia a utilizar en el presente trabajo, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- La cantidad de repeticiones de pentapéptido que permiten la recuperación eficaz de una proteína de interés por ITC tiene un valor óptimo. Este valor es reflejo de la relación de compromiso entre lograr una T_t lo suficientemente baja (para evitar alteraciones en la estructura de proteína de interés) y un nivel de acumulación del ELP en las células tal de lograr una concentración adecuada para la posterior separación. Utilizando varias fusiones proteicas evaluadas a fines de optimizar este parámetro (Conley y col., 2009a), se

encontró que la acumulación de proteína de interés, así como la eficiencia de recuperación mediante ITC se maximiza para un número de repeticiones de entre 30 y 40 pentapéptidos.

- Las relaciones en la composición del aminoácido X en la secuencia repetitiva VPGXG que compone a los ELP influencia, según su naturaleza fisicoquímica, la efectividad de la fusión proteica para expresarse, acumularse en la muestra biológica y recuperarse luego por ITC. En particular, el ELP de composición [1 Lys : 7 Val: 1 Phe] para el aminoácido X ha demostrado su eficiencia, al permitir el enriquecimiento de la fusión proteína de interés-ELP en 95 veces en un paso, respecto de un extracto crudo bacteriano (Lim y col., 2007). Sin embargo, aún no ha sido evaluado si esta secuencia es igualmente efectiva en plantas .

En base a lo expuesto anteriormente, se diseñó el polímero designado como ELP₁ de composición **VG-(VPGVG)₃₂-(VPGFG)₄-GVPGW** (de 187

aminoácidos), cuya secuencia se muestra en detalle en el Apéndice.

Teniendo en cuenta que se deseaba obtener el gen codificante para esta, secuencia aminoacídica, se generó *in silico* la correspondiente secuencia de ADN codificante, teniéndose en cuenta el uso de codones de *Nicotiana benthamiana* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4100>). A ésta última, se le adicionaron los siguientes elementos:

- Secuencia codificante para una señal N-terminal de direccionamiento hacia la vía secretoria;
- Secuencia codificante para un *tag* de seis histidinas (*His-tag*), destinado a utilizarse en una eventual purificación por cromatografía de afinidad;
- Secuencia codificante para la señal KDEL de retención en retículo endoplásmico;
- Sitios de restricción de las enzimas *Pfl*MI y *Bgl*II en los extremos 5' y 3' de la secuencia que codifica el ELP. Las características de estos sitios así como su funcionalidad a la estrategia de este trabajo se discuten más adelante.

Al avanzarse en la lectura de este trabajo, no debe perderse de vista que cuando se habla del “gen sintético ELP₁” o “monómero”, en realidad se está refiriendo a una secuencia nucleotídica

que codifica un polipéptido que es en sí una serie de 36 repeticiones de pentapéptidos. Esta longitud se escogió teniendo en cuenta el trabajo de Conley y col (2009) y la secuencia aminoacídica se basó en las proporciones Lys:Val:Phe recomendadas por Lim y col (2007).

La síntesis del polinucleótido cuya secuencia se obtuvo según se describió fue encomendada a la empresa GenScript (Hong Kong, China). El proveedor cuenta con el servicio adicional de optimización de la secuencia de acuerdo con el uso de codones del organismo empleando un algoritmo propio, que además ajusta el contenido de GC al óptimo del organismo y que mejora la estabilidad del ARNm, remueve secuencias que forman lazos, y elementos *cis* como sitios potenciales de splicing, TATA box, sitios de entrada de ribosomas, etc. Dado que la secuencia de interés contenía 32+4 repeticiones de un pentapéptido esta optimización removió un alto número de secuencias repetidas. El proveedor entrega la secuencia incorporada en el sitio de clonado múltiple del plásmido pUC57.

La estructura final del gen sintético monomérico, al que se da el nombre simplificado de PS-ELP-His-KDEL, se detalla en la Figura III.1 C.

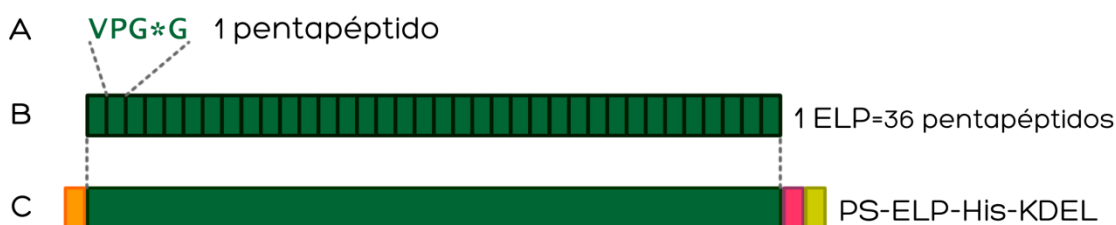


Fig. III.1 Estructura de la construcción del polímero similar a elastina de este trabajo. **A.** Secuencia pentamérica repetitiva. Con un asterisco se ha indicado la posición del aminoácido variable de la secuencia. **B.** “Monómero” de ELP, constituido por 36 repeticiones del pentapéptido VPGXG. **C.** Estructura de la construcción sintética que se desea expresar, en la que al “monómero” ELP se han adicionado los elementos péptido (anaranjado) señal en el extremo N-terminal, e His-tag (rosado) y KDEL (amarillo) en el C-terminal.

2. Subclonado, Manipulación y Multimerización

i. Vector de clonado

Este trabajo involucra la expresión de proteínas recombinantes mediada por agroinfiltración, usando vectores binarios para este fin. En función de esto, fue necesario el diseño de una estrategia que permitiera la manipulación del gen sintético ya descrito, en términos de su multimerización, fusión a otras proteínas y transferencia a vector binario.

Este último paso puede ser convenientemente llevado a cabo mediante el uso del sistema Gateway®, que permite el intercambio de insertos entre vectores vía recombinaciones sitio específicas.

El vector pCR8/GW/TOPO TA (Life Technologies - Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) pertenece a las familias de vectores TOPO® y Gateway®, y permite el clonado rápido de productos de PCR amplificados mediante la enzima Taq-polimerasa. Esta enzima adiciona un residuo extra de adenosina a los extremos 3' de las cadenas de ADN que sintetiza. Los vectores comerciales de la familia TOPO de Invitrogen® se comercializan como moléculas lineales que poseen en cada uno de sus extremos 3' (además de una timidina protruente, capaz de aparearse con la adenosina 3' del producto de PCR) una unión covalente a una enzima topoisomerasa (de ahí su nombre), que cataliza la unión del producto de PCR con el vector, sin necesidad de ligasas, para luego autoescindir.

En el caso particular del vector pCR8/GW/TOPO TA, la inserción ocurre entre los sitios *attL1* y *attL2* del plásmido, que serán necesarios para el

posterior subclonado del inserto en el vector binario.

Cabe destacar que la incorporación del inserto no tiene una orientación preferencial y por ende ésta debe comprobarse a fines de garantizar la dirección correcta de la secuencia. Esto es indispensable para la posterior expresión del gen de interés.

El plásmido pCR8 es de alta copia en *Escherichia coli*, y de tamaño relativamente pequeño (aproximadamente 3,5 pb). Posee además, en su secuencia, un sitio de restricción único para la enzima *XhoI* y tan solo un sitio para *BglI*, correctamente ubicado respecto del de *XhoI* y del sitio de clonado, en términos que se comprenderán mejor más adelante en el texto. Estas cualidades son de necesidad crucial para el desarrollo de las estrategias de multimerización y fusión génica que se discutirán luego.

En conjunto, estas características hacen del pCR8 un vector apto para la manipulación por técnicas de ingeniería genética en el marco de los objetivos de este trabajo.

ii. Vector de expresión

Para la expresión en *N. benthamiana*, se eligió el vector binario pGWB2 (Nakagawa y col., 2007), del cual se destaca, en primer lugar, que posee los sitios necesarios para la inserción por recombinación vía sistema Gateway®. La reacción de recombinación que este sistema emplea implica el uso de una solución enzimática denominada “*LR Clonase® Mix II*” para catalizar la transferencia direccional de una secuencia de ADN flanqueada por los sitios *attL1* y *attL2* de un “clon de entrada” (“*entry clone*” en inglés) a un sitio de clonado de un “vector de destino” (o “*destination vector*”), flanqueado por los sitios *attR1* y *attR2*.

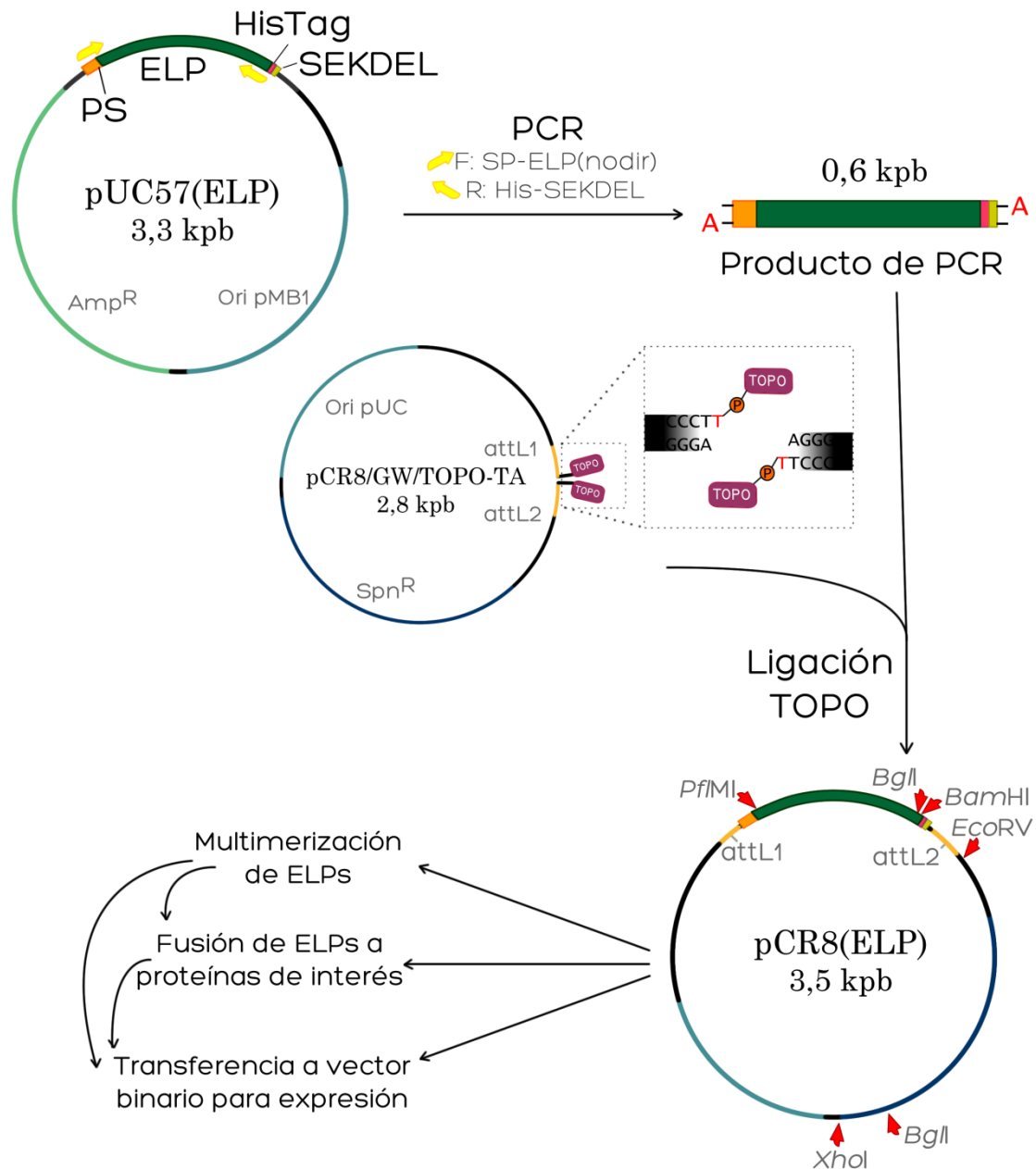


Figura III.2. Flujo de trabajo de los pasos iniciales en la estrategia diseñada para la construcción y expresión de los multímeros y proteínas de fusión de ELP.

El vector pGWB2 contiene la secuencia del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV-35S), que en plantas como *N. benthamiana* funciona como un promotor constitutivo fuerte, ubicado *upstream* respecto del sitio de clonado. De esta manera se posibilita la transcripción por parte de la célula vegetal (una vez que se ha transferido el T-DNA al núcleo)

de la secuencia que se incorpora a pGWB2 mediante la reacción de las clonatas Gateway, siempre que ésta posea los elementos génicos indispensables para tal procesamiento.

La Figura III.2 ilustra el “flujo de trabajo” de la estrategia diseñada como se describió en esta sección.

2. Construcción de los plásmidos que contienen los distintos

ELPs

1. Subclonado del gen sintético en el vector pCR8

El gen sintético SP-ELP-His-KDEL contenido en el plásmido pUC57 se amplificó por PCR mediante Taq-polimerasa usando los *primers* denominados *Forward: SP-ELP(nodir)* y *Reverse: His-SEKDEL*. Las secuencias de los mismos se detallan en la sección Materiales y Métodos. Luego de la reacción, la mezcla se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, y el producto deseado (de 681 pb) se purificó desde el taco de agarosa correspondiente recortado del gel.

El fragmento de ADN solubilizado se sometió a la reacción de ligación TOPO, para luego incorporarse por electroporación en células de la cepa de *E. coli* XL-1 Blue electrocompetentes. Las transformantes, seleccionadas por su resistencia a espectinomicina, son comprobadas por *colony-PCR*, utilizando los mismos *primers* con los que se generó el inserto. El gel resultante de la posterior electroforesis en gel se muestra en la Figura III.3 A.

A partir de algunos de los clones positivos por PCR, seleccionados al azar, se obtuvieron los plásmidos mediante miniprep. La integridad del inserto (en especial, la conservación de los sitios necesarios para los pasos posteriores de la estrategia), así como la correcta orientación del inserto, fueron comprobadas por medio de digestiones con los pares de enzimas de restricción *PfI*MI/*Bgl*II y *Eco*RV/*Bam*HI respectivamente. Los productos de las digestiones fueron separados por

electroforesis en gel, resultando en la imagen que se muestra en la Figura III.3 B, C.

De entre las soluciones plasmídicas comprobadas, hubo cuatro que cumplieron ambas condiciones (las demarcadas #3, #14, #15 y #16). Para ellas se adoptó la nomenclatura pCR8(ELP), en la que “ELP” representa que el plásmido contiene una única copia del gen sintético original, seguido del “número de clon” (es decir, #3, #14, #15, o #16 en este caso).

Se seleccionó arbitrariamente la construcción pCR8(ELP) #15 para continuar con los subsiguientes pasos del procedimiento (aunque todas las demás pueden considerarse equivalentes, dados los resultados anteriormente presentados). La concentración de ADN de las soluciones de plásmidos fueron medidas en espectrofotómetro Nanodrop, obteniéndose valores de concentraciones entre 229,0 y 309,3 ng/μL

2. Obtención del dímero ELP₂: Multimerización por Ligación Recursiva Direccional y por Reconstrucción Plasmídica

Una vez confirmadas la permanencia de los sitios de restricción de *PfI*MI y *Bgl*II, así como la correcta orientación del inserto en el vector respecto de los sitios de recombinación *attL1* y *attL2*, se procede a la multimerización de las repeticiones de ELPs.

En una primera aproximación, se intentó una estrategia de **Ligación Recursiva Direccional (RDL** por sus siglas en inglés), equivalente a la desa—

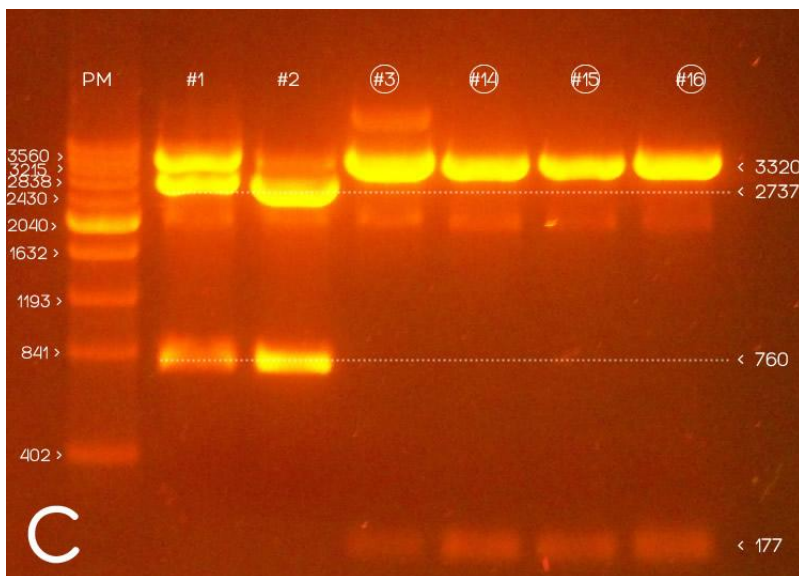
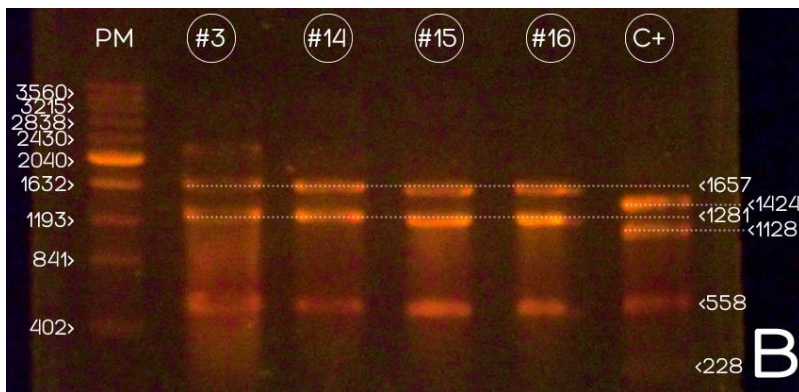
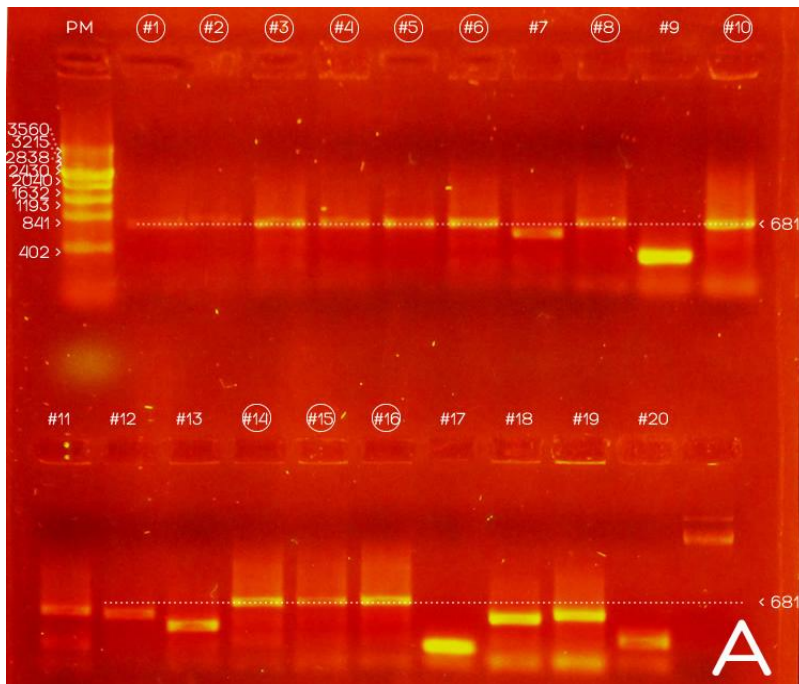


Fig. III.3. Electroforesis en gel **A.** *Colony-PCR* sobre transformantes de la ligación TOPO. Las colonias positivas producen amplificación de un fragmento de 681 pares de bases. Se observan, además, múltiples clones que exhiben inserciones de segmentos de tamaños menores al esperado. Esto puede atribuirse a una posible co-purificación de productos de amplificación parcial junto con el fragmento de interés, a partir de la PCR llevada a cabo como paso preparativo del inserto para la reacción TOPO. **B.** Productos de digestión de los plásmidos aislados a partir de los clones positivos por *Colony-PCR* con las enzimas *PfI*MI y *Bgl*I. La aparición de la banda de 558 pb (fragmento del inserto entre el PS y el His-tag) indica la integridad de los sitios correspondientes, necesarios para pasos posteriores en el proceso. Se usó como control positivo (marcado C+) el clon original conteniendo el gen sintético SP-ELP-His-KDEL. **C.** Productos de digestión con *EcoRV*/*Bam*HI de los mismos plásmidos. La presencia de una banda de 3320 y otra de 177 pb marca la orientación correcta de la inserción. En todos los casos se marcó encerrando el número de clon con un círculo las calles donde los tamaños de banda fueron los esperados.

—rollada por Meyer y Chilkoti (Meyer y Chilkoti, 2002b). El lineamiento general de la misma se esquematiza en la Figura III.4.

El gen monomérico introducido en el vector pCR8 en el paso anterior se escinde del mismo por digestión con las enzimas de restricción *PfI*MI y *Bgl*I para preparar el fragmento al que denominaremos

GCCNNN▼NNGGC	CCANNN▼NNTCC	GCANNN▼NNTGC
CGGNN▲NNNCCG	GGTNN▲NNNAGG	CGTNN▲NNNACG
<i>Bgl</i> II	<i>Pf</i> IMI	<i>Bst</i> API

GCCNNNNNTCC		GCANNNNNTCC
CGGNNNNNAGG		CGTNNNNNAGG
<i>Bgl</i> II × <i>Pf</i> IMI		<i>Bst</i> API × <i>Pf</i> IMI

Recuadro III.1. Secuencias de los sitios de restricción para las enzimas especiales usadas en este trabajo y secuencias generadas por la ligación de extremos cohesivos generados mediante esas enzimas. La característica que las tres comparten es que reconocen secuencias discontinuas, en las que el sitio de corte (marcado con triángulo negro) se encuentra flanqueado por las secuencias de reconocimiento, en vez de formando parte de ellas. Esto permite el diseño de secuencias en las que los nucleótidos variables N se seleccionan de manera de producir extremos cohesivos al cortarse con enzimas distintas. Obsérvese que, como se muestra arriba, la ligación de estos tipos de extremos producidos por *Bgl*II/*Pf*IMI o por *Bst*API/*Pf*IMI no regenera ninguno de los dos sitios de restricción originales. Este hecho es aprovechado por las estrategias de ligación recursiva direccional puestas en práctica en este trabajo.

inserto en esta etapa; por otra parte, la misma construcción se digiere solamente con la enzima *Pf*IMI, resultando en su linealización, para dar el fragmento al que llamaremos **vector**. Dadas las características de los sitios de restricción involucrados (que se discutirán a la brevedad), se ha diseñado la secuencia del gen sintético de manera que los fragmentos de ADN generados por la digestión recién descrita tienen extremos direccionalmente compatibles, tales que el **inserto** puede ligarse con el **vector** en una única orientación posible. El resultado de esta ligación, tal como lo muestra la Figura III.4, es la construcción que podríamos representar SP-ELP-ELP-His-KDEL contenida en el vector pCR8 [es decir, según la nomenclatura adoptada para este trabajo, pCR8(ELP₂)]. En el producto final, el sitio de unión entre las repeticiones del monómero ha perdido las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción empleadas para generarlo, mientras que se conservan estos sitios en los extremos de la primera y la última repetición. Esto habilita el uso del mismo procedimiento sobre la nueva construcción, para obtener así otras con mayor número de repeticiones en rondas sucesivas.

Obsérvese que esta característica de “recursividad” de la estrategia de multimerización está dada por las propiedades de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción del tipo de *Pf*IMI y *Bgl*II, que se discuten en el Recuadro III.1.

De las numerosas condiciones probadas para este procedimiento (entre las que se variaron los volúmenes de los componentes y los tiempos de reacción de las digestiones, las condiciones de purificación -desde electroforesis en gel- de los fragmentos producidos, las relaciones de concentración **inserto:vector** en la reacción de ligación, y el método de transformación), ninguna permitió comprobar la obtención satisfactoria de la construcción buscada. Esto, presumiblemente, se debió a la capacidad del fragmento **vector** de religarse consigo mismo (dada la compatibilidad de sus extremos libres), produciendo nuevamente la molécula original pCR8(ELP). Siendo esta reacción de orden cero, se ve cinética y estadísticamente favorecida frente a la condensación con el fragmento **inserto**, de orden uno. En consecuencia, de las colonias obtenidas por la transformación del producto de ligación, la mayoría de las

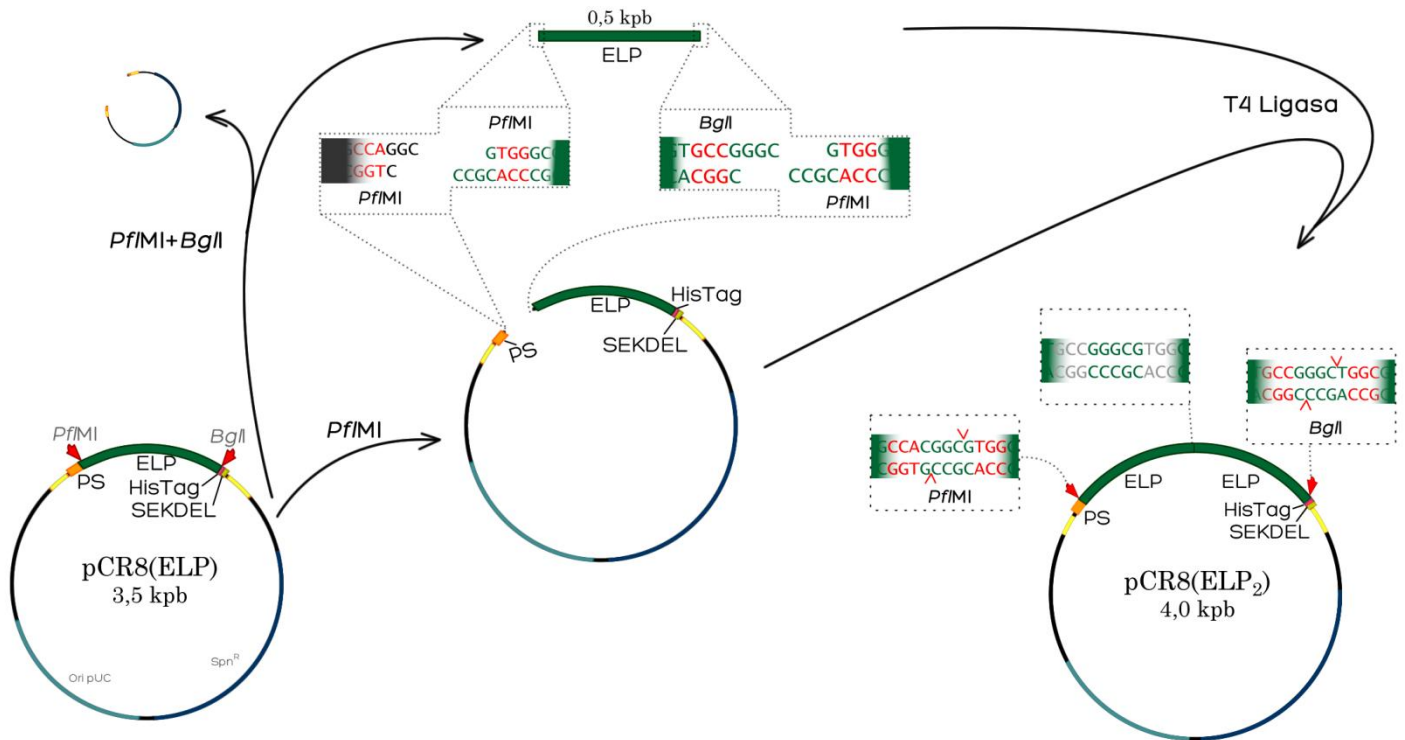


Fig.III.4. Ligación Recursiva Direccional (RDL). Las enzimas de restricción elegidas –en base a cuyas secuencias diana se diseñó el gen sintético– permitirían la inserción direccional de una copia del gen entre el péptido señal y la copia original del ELP ya presente en el plásmido para dar lugar a la formación del dímico de ELPs. El producto final conserva solamente un sitio *PfiMI* y un *BglI*, ya que en la ligación de un extremo generado por *PfiMI* con uno generado por *BglI* se elimina la secuencia blanco reconocida por estas enzimas. Se indican en kilopares de bases (kpb) los tamaños aproximados de los vectores/fragmentos.

colonias resultantes, controladas mediante *colony-PCR*, evidencian por mayoría abrumadora contener el plásmido pCR8(ELP) religado. Esto es, el “ruido” (o “background”) del experimento es órdenes de magnitud mayor que la “señal”.

A cuentas de esto, se intentó adicionar en la estrategia un paso de desfosforilación del fragmento **vector** con fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP), antes de la ligación. Los controles implementados fueron: (1) transformación de pCR8(ELP) digerido con *PfiMI*, sin ligar y (2) transformación de pCR8(ELP) digerido con *PfiMI* y tratado con fosfatasa alcalina, sin ligar. Cuando las bacterias así transformadas se cultivaron en medio selectivo, el control (1) produjo un crecimiento bacteriano del orden de 10 colonias por placa, mientras que para el control (2) el número de colonias producidas es del orden de 100. Este resultado, además de ser contradictorio,

determinó que se desechará el tratamiento de desfosforilación como medida superadora del problema presentado.

Esta dificultad fue finalmente superada por medio de la aplicación del método de **Ligación Recursiva Direccional por Reconstrucción de Plásmido** (*Re-RDL*, según sus siglas en inglés, tal como se la describe en (Mcdaniel y col., 2010)), que no es sino una variante del método *RDL* anteriormente descrito. Su lineamiento general se representa en la Figura III.5.

Siguiendo esta estrategia, se digirieron alícuotas de pCR8(ELP) con *PfiMI/XhoI* y *BglI/XhoI*, por separado. Dada la incompatibilidad de los buffers requeridos para las actividades de *PfiMI* y *BglI* respecto del necesario para *XhoI*, fue necesario realizar las digestiones en pasos secuenciales.

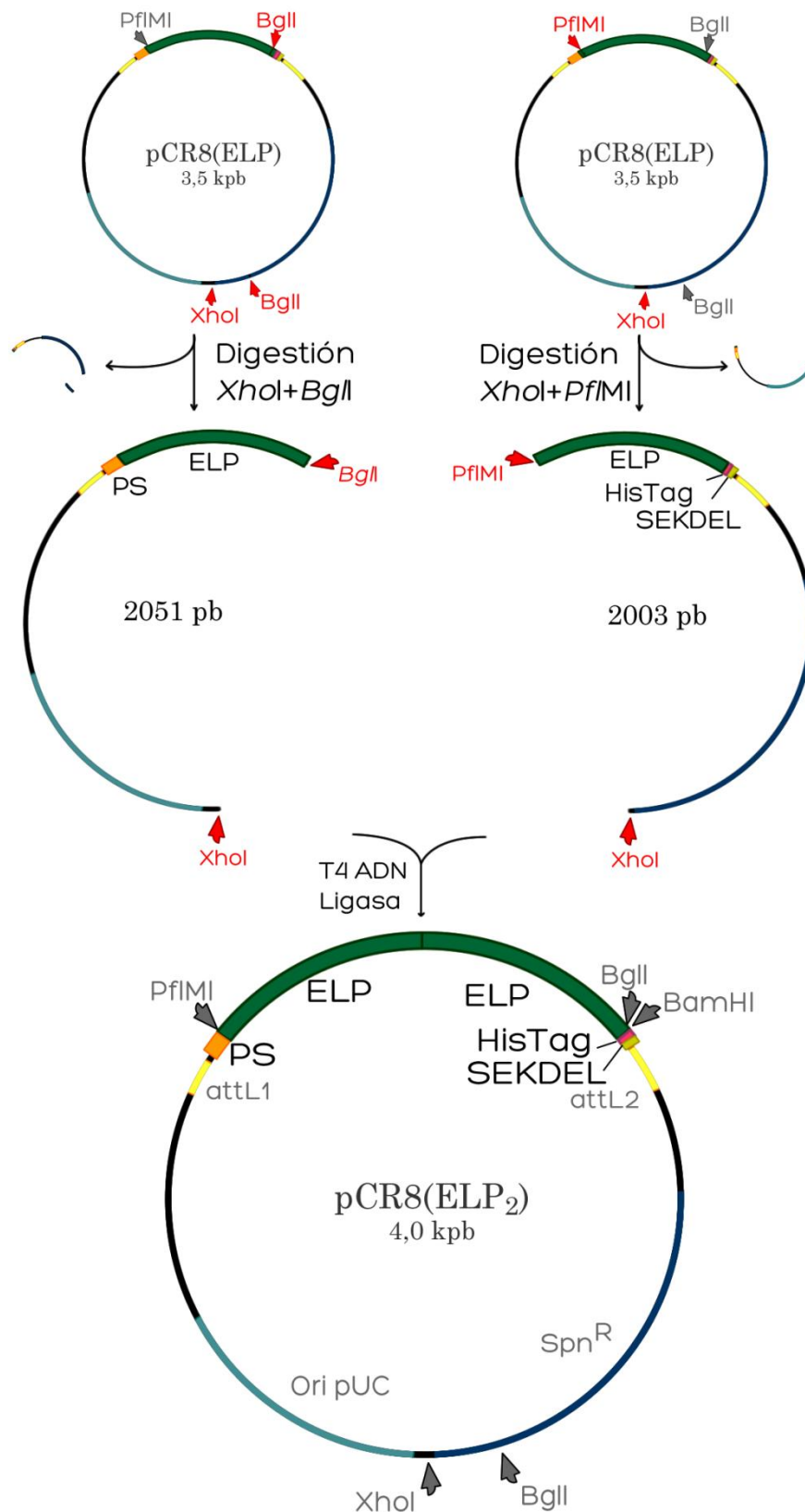


Fig.III.5. Primera ronda de Ligación Recursiva Direccional por Reconstrucción Plasmídica (*Re-RDL*), que da lugar al dímero de ELP en el plásmido pCR8, para el cual se adopta la nomenclatura pCR8(ELP₂). Se marcan con flechas y caracteres rojos las enzimas de restricción (y sus sitios correspondientes) empleados para generar cada fragmento. Obsérvese que en la unión entre las repeticiones del gen sintético ELP, los extremos cohesivos que se ligan son generados por las enzimas *PflMI* y *BglI* en cada fragmento, y que ninguno de los dos sitios se conserva en el producto de ligación, al igual que se mostró en la Fig. II.4 para el método de RDL. Se indican los tamaños en pares de bases (pb) de los fragmentos producidos por digestión y en kilopares de bases (kpb) los de los plásmidos.

De esta manera, se generaron dos fragmentos de interés: uno de 2051 pb (digestión *Bgl*I/*Xho*I), que contiene la secuencia codificante para un ELP flanqueada por la secuencia que codifica al péptido señal SP en su lado 5' y por un extremo libre generado por *Bgl*I en el 3'; el otro, de 2003 pb (digestión *Pf*I/*M*I/*Xho*I), contiene la secuencia que codifica un ELP flanqueada por un extremo libre generado por *Pf*I/*M*I en el 5' y por las secuencias codificantes para His-tag y la señal de direccionamiento SEKDEL en el 3'. La doble digestión garantiza que estos dos

fragmentos puedan ligarse entre sí (por la compatibilidad de los sitios especialmente diseñados de *Bgl*I y *Pf*I/*M*I, y de los sitios *Xho*I), pero no autoligarse (dadas las incompatibilidades de los sitios *Xho*I y *Bgl*I por un lado y *Xho*I y *Pf*I/*M*I por el otro). Aún si lo hicieran, el producto generado no sería un plásmido funcional. El producto de la ligación deseado, además de “reconstruir” un plásmido funcional (de ahí el nombre de la estrategia), contiene dos repeticiones del gen sintético original ELP.

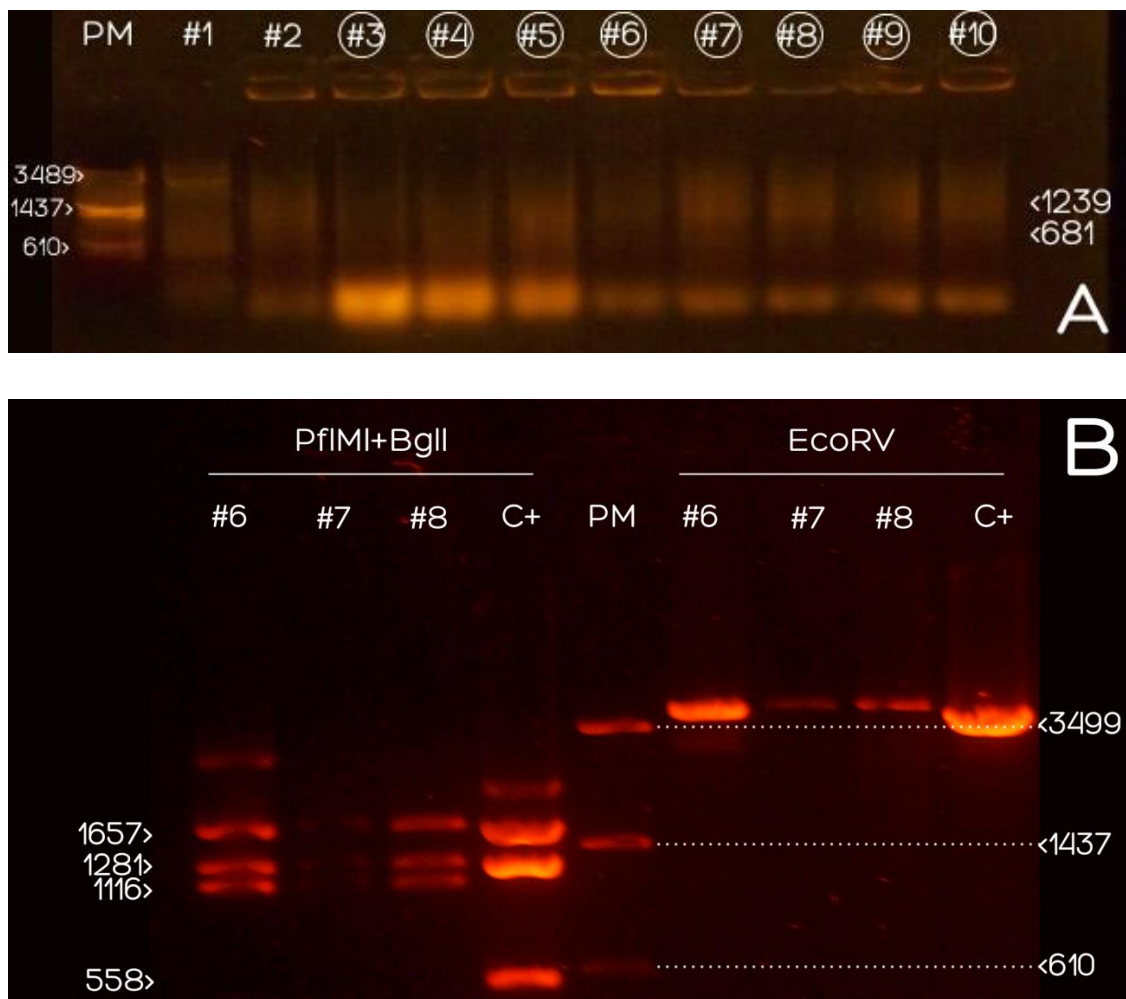


Fig.III.6. A. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de *colony-PCR* realizada sobre las colonias de transformantes de la primera ronda de ligación recursiva direccional por reconstrucción plasmídica. Una vez más, se evidencia el patrón de bandas difuso, típico del sistema, y atribuido a la alta repetitividad de la secuencia del gen ELP. **B.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de los plásmidos aislados a partir de los clones positivos por *Colony-PCR* para pCR8(ELP₂), con las enzimas *Pf*I/*M*I y *Bgl*I, y con *Eco*RV. Como control positivo de ambas reacciones se realizaron las mismas digestiones sobre el plásmido pCR8(ELP) (calles marcadas C+). En la primera y la cuarta calle, las bandas de las que no se especifica el tamaño se atribuyen a productos de digestión parcial de los vectores correspondientes. Los tamaños indicados a la izquierda son los esperados para la construcción pCR8(ELP₂) digerida con *Pf*I/*M*I y *Bgl*I. En la linealización del vector con *Eco*RV se pone en evidencia el aumento de tamaño del pCR8(ELP₂) respecto del control pCR8(ELP).

Los fragmentos de interés fueron separados por electroforesis, purificados y ligados entre sí. El producto de esta reacción fue transformado por electroporación en *E. coli* XL-1 Blue. Las colonias de bacterias transformantes son comprobadas mediante *colony-PCR* utilizando los *primers Forward: SP-ELP(nodir)* y *Reverse: His-SEKDEL*. El resultado de la electroforesis en gel con la que se analizó el producto de la PCR se muestra en la Figura III.6 A. La presencia del inserto se confirma por digestión con *PfI*MI y *Bgl*II, (que causa la escisión del inserto, de 1116 pb), y con *EcoRV* (que linealiza el plásmido, exponiéndose así el aumento de tamaño del vector ocasionado por la multimerización el inserto desde 3496 hasta 4054 pb) (Figura III.6 B). Dado el carácter direccional de la ligación, condicionado por la complementariedad de los sitios de restricción, es innecesario comprobar la orientación del inserto en la construcción resultante.

Téngase en consideración el importante porcentaje de colonias positivas por PCR sobre el total de colonias chequeadas para la dimerización del gen sintético ELP. Obsérvese también que de éstas, todas las comprobadas por mapeo de restricción confirmaron el resultado positivo. **Estos son hechos que dan cuenta de la robustez del método de *Re-RDL* para la multimerización en tándem de secuencias repetidas.**

De esta forma se obtuvo la construcción denominada en adelante pCR8(ELP₂), donde el subíndice 2 indica que contiene dos copias del gen sintético de ELP original contenidas entre las secuencias que codifican el péptido señal (en el extremo 5') y el *His-tag* junto con la secuencia de direccionamiento KDEL (en el extremo 3').

3. Obtención de la fusión génica SP-mCherry-ELP-His-KDEL

i. Obtención de la construcción preliminar SP-mCherry-His-KDEL

Al igual que con la dimerización del gen sintético ELP, los intentos por lograr esta fusión por medio del método de Ligación Recursiva Direccional (RDL) no dieron frutos. Se optó entonces por utilizar también una estrategia similar a la de Ligación Recursiva Direccional por Reconstrucción de Plásmido (Re-RDL). Para ello, fue necesario lograr en un paso preliminar la construcción pCR8(SP-mCherry-His-KDEL), que se esquematiza en la Figura III.7. Esto a su vez implicó la amplificación por PCR del gen sintético mCherry desde el plásmido pCR2.1(mCherry), con el que ya se contaba en el grupo de investigación, utilizándose los *primers Forward: BstAPI-mCherry* y *Reverse: mCherry-BamHI*. Este paso añade a los extremos de la secuencia codificante de la proteína fluorescente roja los sitios de restricción para las enzimas *BstAPI* en el extremo 5' y *BamHI* en el 3', necesarios en etapas posteriores.

Para posibilitar su manipulación, el fragmento así amplificado fue clonado en el vector pCR8/GW/TOPO/TA, tal como se describió para la introducción del gen sintético SP-ELP-His-KDEL en el mismo vector. Sobre el plásmido obtenido se efectuó una doble digestión con *BstAPI* y *BamHI* para liberar el inserto. El fragmento de interés fue separado por electroforesis en gel y purificado.

A su vez, se digirió, por separado, el plásmido pCR8(ELP)#15 con *PfI*MI y *BamHI*, escindiéndose así la secuencia del gen ELP contenida entre las del péptido señal y la del *His-tag*. Los productos de digestión fueron también separados por electroforesis, cortándose la banda de gel correspondiente al fragmento de plásmido externo al ELP

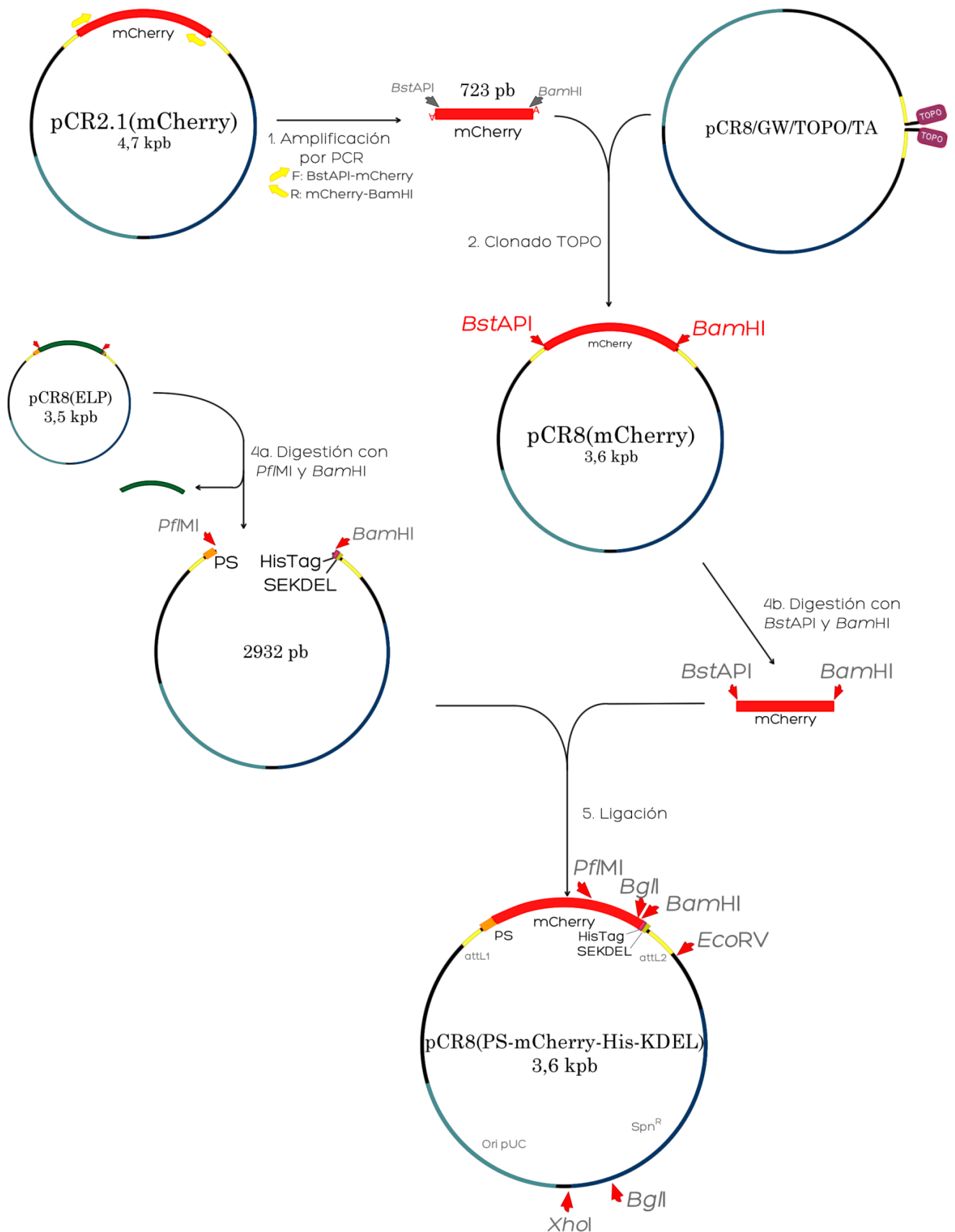


Fig.III.7. Esquema del proceso de obtención de la construcción preliminar PS-mCherry-His-SEKDEL en el plásmido pCR8, a partir de los plásmidos pCR2.1(mCherry) y pCR8(ELP). El paso de amplificación por PCR y subclonado en pCR8 sirve para adicionar, tal como se indica, los sitios de restricción *BstAPI* y *BamHI*, necesarios para el paso siguiente. Los pasos 4 y 5 permiten la incorporación de los elementos PS, His-tag y KDEL, del modo que se muestra en la imagen, para llegar a la construcción pCR8(PS-mCherry-His-KDEL) que posibilita en un paso posterior, mediante una estrategia basada en *Re-RDL*, la fusión PS-ELP-mCherry-His-SEKDEL.

liberado y eluyéndose el ADN de la misma.

Los dos fragmentos así obtenidos fueron entonces ligados entre sí. Esto fue posibilitado por la compatibilidad de los extremos cohesivos generados por los cortes de *Bst*API y *Pfl*MI por un lado y de *Bam*HI por el otro. El proceso general se esquematiza en la Figura III.8.

La mezcla de ligación fue posteriormente transformada por electroporación en bacterias *E. coli* XL-1 Blue electrocompetentes. La presencia de la construcción deseada fue evidenciada por *colony-PCR* sobre colonias de cultivo en medio sólido selectivo, usando el par de *primers Forward: BstAPI-mCherry* y *Reverse: His-SEKDEL*

iii. Ligación Recursiva por Reconstrucción de Plásmido para obtener la fusión génica SP-mCherry-ELP-His-KDEL

Una vez obtenida la construcción SP-mCherry-His-KDEL, se pudo desarrollar una estrategia de Ligación Recursiva por Reconstrucción de Plásmido para obtener la secuencia codificante de la proteína de fusión SP-mCherry-ELP-His-KDEL, de modo similar al empleado para lograr los multímeros de ELP.

El plásmido pCR8(SP-mCherry-His-KDEL)#2 conteniendo la secuencia construida en la etapa anterior fue digerido con el par de enzimas *Bgl*II/*Xho*I. Los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y a partir del mismo gel se aisló la banda correspondiente a 2198 pb y se procesó para extraer el ADN incluido en ella. Para simplificar la notación, este segmento –cuyo esquema se ilustra en la Figura III.8 A– recibe la denominación arbitraria de fragmento **A**.

Por otra parte, el plásmido pCR8(ELP)#15, que contiene la

construcción SP-ELP-His-KDEL, fue digerido con las enzimas *Pfl*MI y *Xho*I para liberar el fragmento en adelante denominado **B**, esquematizado en la Figura III.8A.

La subsiguiente ligación entre los fragmentos purificados **A** y **B** da lugar a la fusión génica en marco entre el péptido señal-mCherry provenientes de la construcción preliminar pCR8(SP-mCherry-His-KDEL) y el ELP-His-SEKDEL provenientes de la construcción pCR8(ELP). **En adelante, se utilizará la abreviatura pCR8(mCherry-ELP) para referirse a esta construcción.** Téngase en cuenta que, aunque no se expliciten en esta notación, están presentes las secuencias codificantes para los demás elementos ya mencionados (es decir, el péptido señal –*upstream*– y el His-tag y la señal de direccionamiento SEKDEL –*downstream*, respecto de los genes de interés fusionados–).

Luego de transformado el producto de la ligación en *E. coli* XL-1, las colonias obtenidas fueron analizadas por *colony-PCR*, utilizándose el par de *primers Forward: BstAPI-mCherry* y *Reverse: His-SEKDEL*. La electroforesis en gel posterior arrojó el patrón de bandas exhibido en la Figura III.8 B: la totalidad de las colonias chequeadas evidencian amplificación del tamaño esperado (de 1321 pb) para la construcción pCR8(mCherry-ELP). Esto puede verse como una muestra de la **robustez de los métodos de Re-RDL para generar fusiones génicas, prácticamente sin dejar lugar a la aparición de “fondo” o “background”**.

4. Transferencia a vector binario de expresión

Como se indicara con anterioridad, este paso se llevo a cabo utilizando la tecnología Gateway®. Las generalidades de la reacción se ejemplifican para el caso

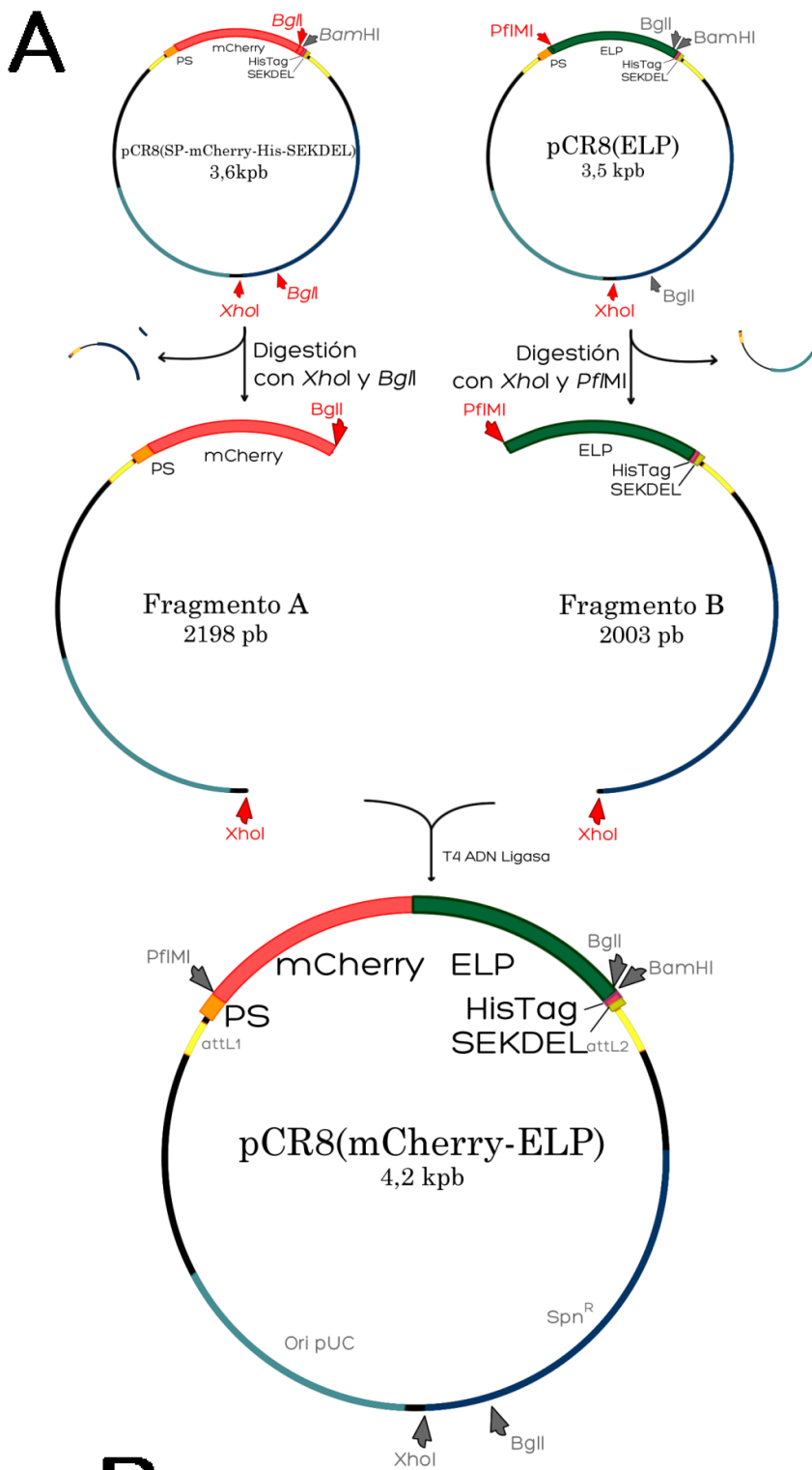
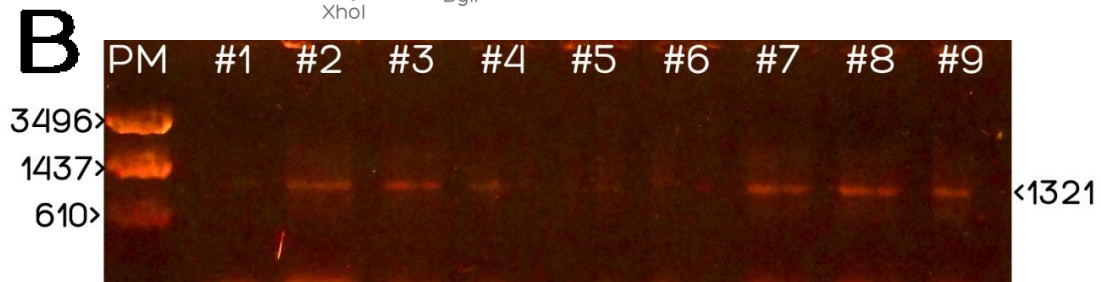


Fig.III.8. A. Obtención de la fusión génica PS-mCherry-ELP-His-SEKDEL en el plásmido pCR8 [simbolizada como pCR8(mCherry-ELP)] a partir de los plásmidos pCR8(PS-mCherry-His-SEKDEL) y pCR8(ELP), por una estrategia de *Re-RDL*. Se marcan con flechas y caracteres rojos las enzimas de restricción (y sus sitios correspondientes) empleados para generar cada fragmento.

B. Electroforesis en gel de agarosa de la *colony-PCR* de las bacterias transformadas con la ligación de los fragmentos **A+B**. El producto de ésta última reacción es la fusión génica PS-mCherry-ELP-His-SEKDEL contenida en el plásmido pCR8. Para esta construcción se adopta la denominación pCR8(mCherry-ELP). Los primers utilizados para la PCR fueron *Forward: BstAPI-mCherry* y *Reverse: His-KDEL*. Apréciase que todas las colonias chequeadas resultaron positivas para este análisis.



particular de pCR8(ELP) en la Figura III.9 A.

La siguiente es una lista de las construcciones que se sometieron a la recombinación LR, a manera de “clones de entrada”:

- pCR8(ELP) #15
- pCR8(ELP₂) #8
- pCR8(PS-mCherry-His-SEKDEL) #2
- pCR8(mCherry-ELP) #10

En el caso del primero de los anteriores, la reacción se llevó a cabo exactamente de la manera descrita antes. Para todos los demás casos, al hacer lo mismo, no se consiguió producir los correspondientes clones de pGWB2. Siguiendo la recomendación del fabricante explicitada en el manual del vector (Nakagawa, 2002), para aumentar la eficiencia del proceso, se linealizó mediante digestión con *XhoI* el vector de

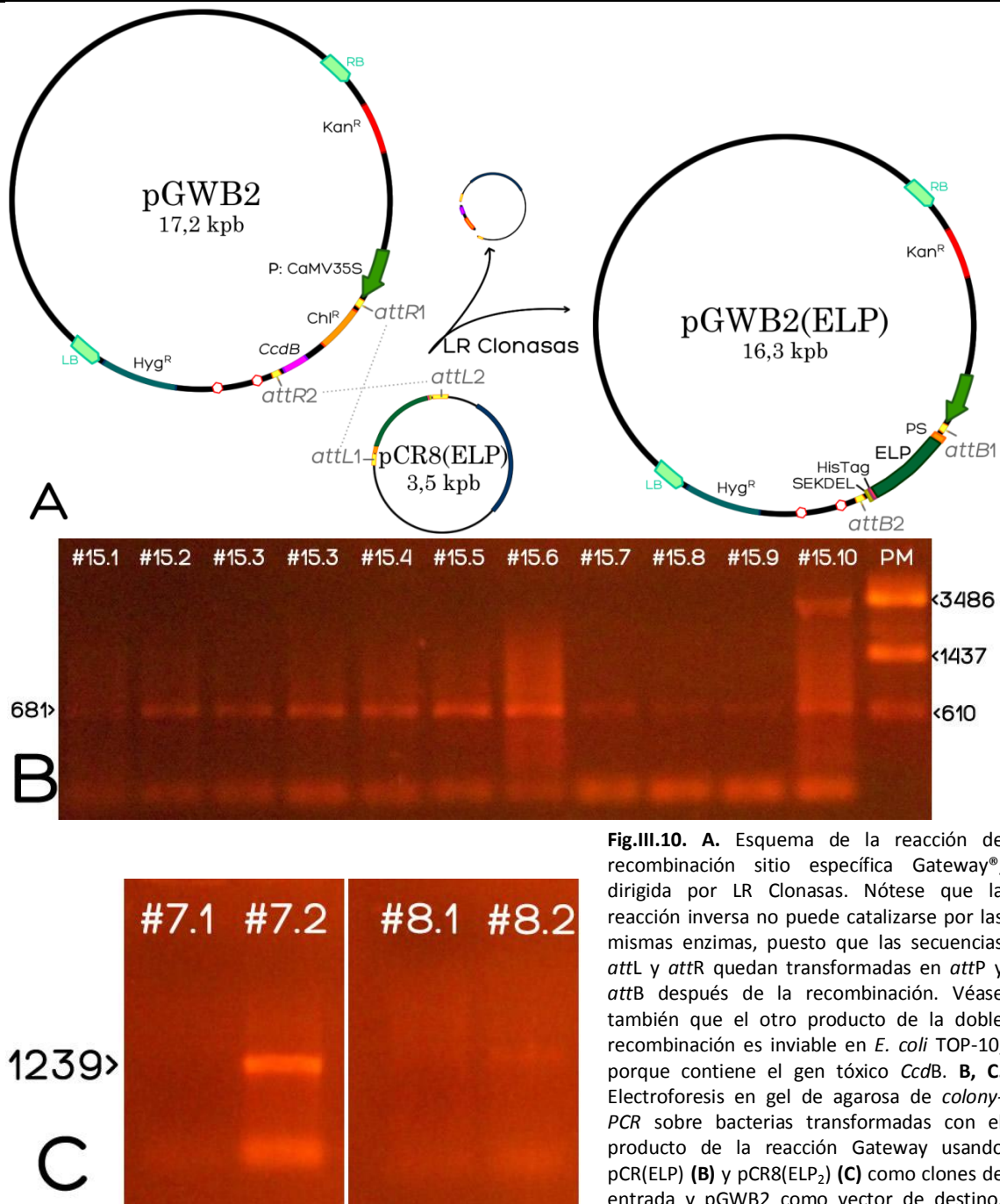


Fig.III.10. A. Esquema de la reacción de recombinación sitio específica Gateway®, dirigida por LR Clonadas. Nótese que la reacción inversa no puede catalizarse por las mismas enzimas, puesto que las secuencias *attL* y *attR* quedan transformadas en *attP* y *attB* después de la recombinación. Véase también que el otro producto de la doble recombinación es inviable en *E. coli* TOP-10, porque contiene el gen tóxico *CcdB*. B, C. Electroforesis en gel de agarosa de *colony-PCR* sobre bacterias transformadas con el producto de la reacción Gateway usando pCR(ELP) (B) y pCR8(ELP₂) (C) como clones de entrada y pGWB2 como vector de destino. Los primers utilizados en ambos casos fueron *Forward: SP-ELP(nodir)* y *Reverse: His-KDEL*.

destino antes de re-purificarlo y someterlo a la reacción.

La mezcla de reacción fue transformada químicamente, utilizándose la cepa de *E. coli* TOP-10, que es apta para este tipo de método y además es susceptible a la acción del gen *CcdB*, usado como marcador de selección negativa. Obsérvese que la recombinación mediada por clonasa LR provoca la pérdida de la secuencia codificante para la toxina.

Las bacterias transformadas, seleccionadas por su resistencia a kanamicina, fueron chequeadas por *colony-PCR* cuyo resultado, analizado mediante electroforesis en gel de agarosa, se exhibe en la Figura III.10 B, C. Los primers utilizados fueron *Forward: SP-ELP(nodir)* y *Reverse: His-SEKDEL* para el monómero y el dímero de ELP y *Forward: BstAPI-mCherry* y *Reverse:*

His-SEKDEL para la construcción de mCherry. Hasta el momento, solo se logró obtener colonias positivas para las construcciones pGWB2(ELP) y pGWB2(ELP₂). Las posteriores etapas del trabajo se continúan en base a estas dos, además de otras construcciones con las que el grupo de investigación ya contaba.

Para los clones de las construcciones generadas mediante la reacción de las clonasa se adoptó la siguiente nomenclatura: **#[número del “clon de entrada”].[número de clon]**. De esta manera, por ejemplo, los clones pGWB2(ELP)#15.n contienen un plásmido que se generó al recombinar mediante clonasa LR el “vector de destino” pGWB2 con el vector “de entrada” pCR8(ELP)#15.

Expresión de las construcciones en *Nicotiana benthamiana*

I. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

A partir de los clones detectados como positivos mediante el *colony-PCR* anterior (recuérdese que se trata de cultivos de la cepa TOP-10 de *E. coli*), se prepararon los plásmidos pGWB2(ELP) y pGWB2(ELP₂) se verificó su tamaño y se transformó por electroporación células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Las transformantes se cultivaron en medio sólido selectivo suplementado con gentamicina (a la que la cepa es resistente por sí misma) y kanamicina (para seleccionar las transformadas con pGWB2). Las colonias de este cultivo se comprobaron por *colony-PCR*, encontrándose que en ambos casos la mitad evidenciaron amplificación. De

entre los positivos, se eligió un clon de cada construcción al azar.

II. Agroinfiltración

Se prepararon cultivos líquidos en medio YEB selectivo (gentamicina y kanamicina) de ambos clones logrados en el paso anterior, así como de los clones de *A. tumefaciens* GV3101 conteniendo las construcciones pBIN61-p19 (Voinnet y col., 2003), pGWB2- γ -Cherry y pGWB2-GFP-KDEL (Mangano y col., 2011).

La proteína p19, propia del virus TBSV (por *Tomato Bushy-Stunt Virus*) es un supresor del silenciamiento postrascriptural (PTGS) que funciona uniéndose a ARN de doble hebra generado por la maquinaria molecular que dirige ese proceso (Silhavy y col.,

2002). Se sabe que su expresión es capaz de incrementar sensiblemente la producción de proteínas recombinantes en tejido foliar (Voinnet y col., 2003).

El plásmido pGWB2(γ -Cherry) contiene la secuencia codificante de la proteína de

fusión entre la cadena pesada del anticuerpo 14D9 y la proteína fluorescente roja Cherry (derivada de RFP) (Shaner y col., 2004). La γ -Cherry se acumula en el RE pues en ausencia de la cadena liviana no completa su plegado y

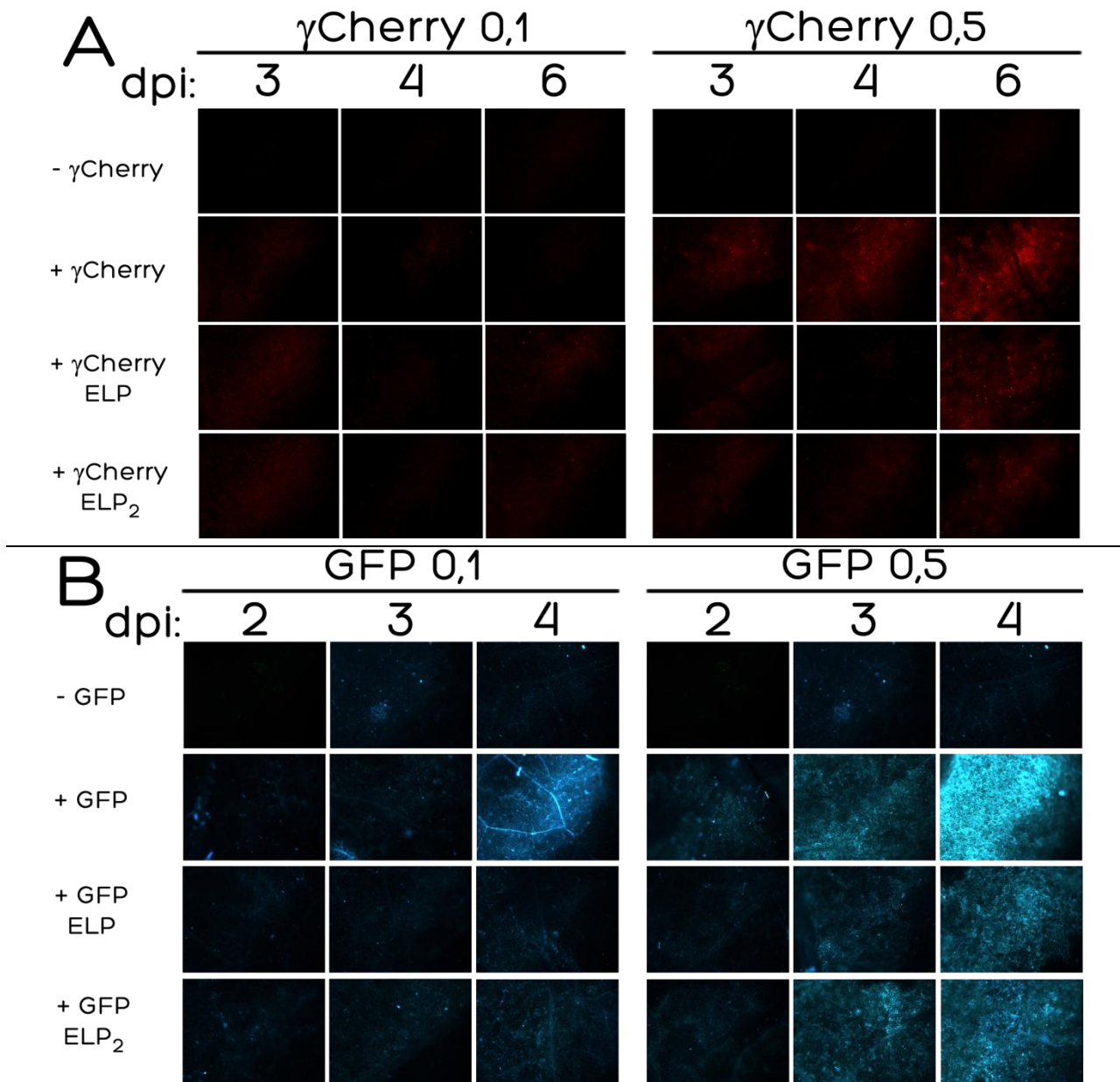


Fig.III.11: Efecto de los ELP en la acumulación de proteínas fluorescentes en hojas de *N. benthamiana*. Se emplearon dos construcciones reporteras, ambas marcadoras del retículo endoplásmico: γ Cherry (Panel A) y GFP-KDEL(Panel B). Estas construcciones, junto con las efectoras: ELP y ELP₂ (indicadas a la izquierda de las figuras), fueron agroinfiltradas. Se siguió la acumulación de las proteínas fluorescentes empleando un microscopio de disección fluorescente Leica MZ10F con filtros para DsRed y GFP. Las filas marcadas - γ Cherry y -GFP indican la condición control de autofluorescencia, en la que no se infiltró con las construcciones reporteras. La cantidad de reportero empleado se indica entre paréntesis: DO₆₀₀ 0,1 y 0,5. **Todas las hojas** fueron infiltradas además con agrobacterias llevando el supresor del silenciamiento génico p19 de TBSV (DO₆₀₀ 0,5). Las agrobacterias llevando los ELP se emplearon a una DO₆₀₀ 0,5. Se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia con el tiempo en los lapsos ensayados. Para ambos reporteros, la co-expresión de los genes de ELP y ELP₂ parece disminuir la intensidad de fluorescencia. Las barras blancas equivalen a una distancia de 1 mm. Dpi: días post infiltración.

queda retenida por su interacción con BiP (González, 2010; Mangano y col., 2011). Por su parte, la construcción GFP-KDEL es un marcador habitualmente empleado para visualizar el retículo endoplásmico. (Haseloff y col., 1997). Ambas construcciones reporteras se utilizaron por separado para evaluar el efecto de las construcciones efectoras conteniendo los ELP. Se ensayaron para cada construcción reportera dos densidades de cultivo bacteriano, 0,1 y 0,5 unidades de DO₆₀₀. La acumulación se evaluó utilizando microscopio estéreo de disección, con filtros para fluorescencia [filtros GFP, para las plantas transformadas con GFP-KDEL y DS-Red para las transformadas con pGWB2(γ Cherry)]. En la Figura III.11 se muestra las micrografías obtenidas para ambos reporteros entre los 2 y los 6 días post-infiltración (dpi). Todas las fotografías fueron tomadas con la misma ganancia y tiempo de exposición y procesadas de la misma manera de forma que las intensidades de fluorescencia se puedan comparar. Puede observarse que las fluorescencias más altas se obtuvieron para los reporteros agroinfiltrados con p19 al último día evaluado y que en presencia de ELP₁ y ELP₂ hay una disminución de la intensidad para las 4 condiciones de ensayo utilizadas.(Figura III, 11)

III. Microscopía Confocal

Formación de cuerpos proteicos

Conociendo que a los 4 dpi la expresión del reportero ya está bien establecida, a este tiempo se realizaron observaciones empleando un microscopio Invertido DMI 6000 CS motorizado acoplado a un Láser Confocal Espectral (CLSM) de muestras de tejido foliar co-transformado con las construcciones γ Cherry y ELP₂.

Tal como puede apreciarse en las micrografías de la Figura III.12 (A y B, primera fila de cada panel), las proteínas

fluorescentes utilizadas como reporteros presentan un patrón de localización típicamente reticular. En contraste, cuando se co-infiltra la construcción ELP₂ junto con las primeras, este patrón se modifica drásticamente, observándose la presencia de estructuras globulares con mayor densidad de fluorescencia.

Una observación equivalente hecha sobre tejido de hojas co-infiltradas con las construcciones GFP-KDEL y ELP₂ a 3 dpi arroja resultados equivalentes, como puede verse en la Figura III.12 B.

Estos resultados muestran que la co-expresión con un polímero similar a elastina es capaz de inducir la acumulación de una proteína de interés en cuerpos proteicos del RE. Esto puede ser de interés cuando se desea sobreexpresar una proteína susceptible a la degradación por proteasas intracelulares, puesto que los PB proveen un entorno confinado especial para la acumulación de grandes cantidades de proteína (Llop-Tous y col., 2011).

Sin embargo, las observaciones en el microscopio de disección fluorescente parecerían indicar un impacto negativo sobre la acumulación de los reporteros ensayados. Resta, a futuro, evaluar esta cuestión por métodos bioquímicos cuantitativos.

Movilidad de los cuerpos proteicos

Como ya se dijo, la observación al microscopio confocal de la co-infiltración GFP-KDEL y pGWB2(ELP₂) fue realizada a menor tiempo post-infiltración. Posiblemente a consecuencia de esto, la cantidad de cuerpos proteicos, así como su tamaño, fueron menores en comparación con las observadas en células transformadas con el otro reportero.

Sin embargo, la diferencia más notable entre ambos ensayos fue la presencia de movimiento de los cuerpos proteicos conteniendo GFP. Esto es consistente con

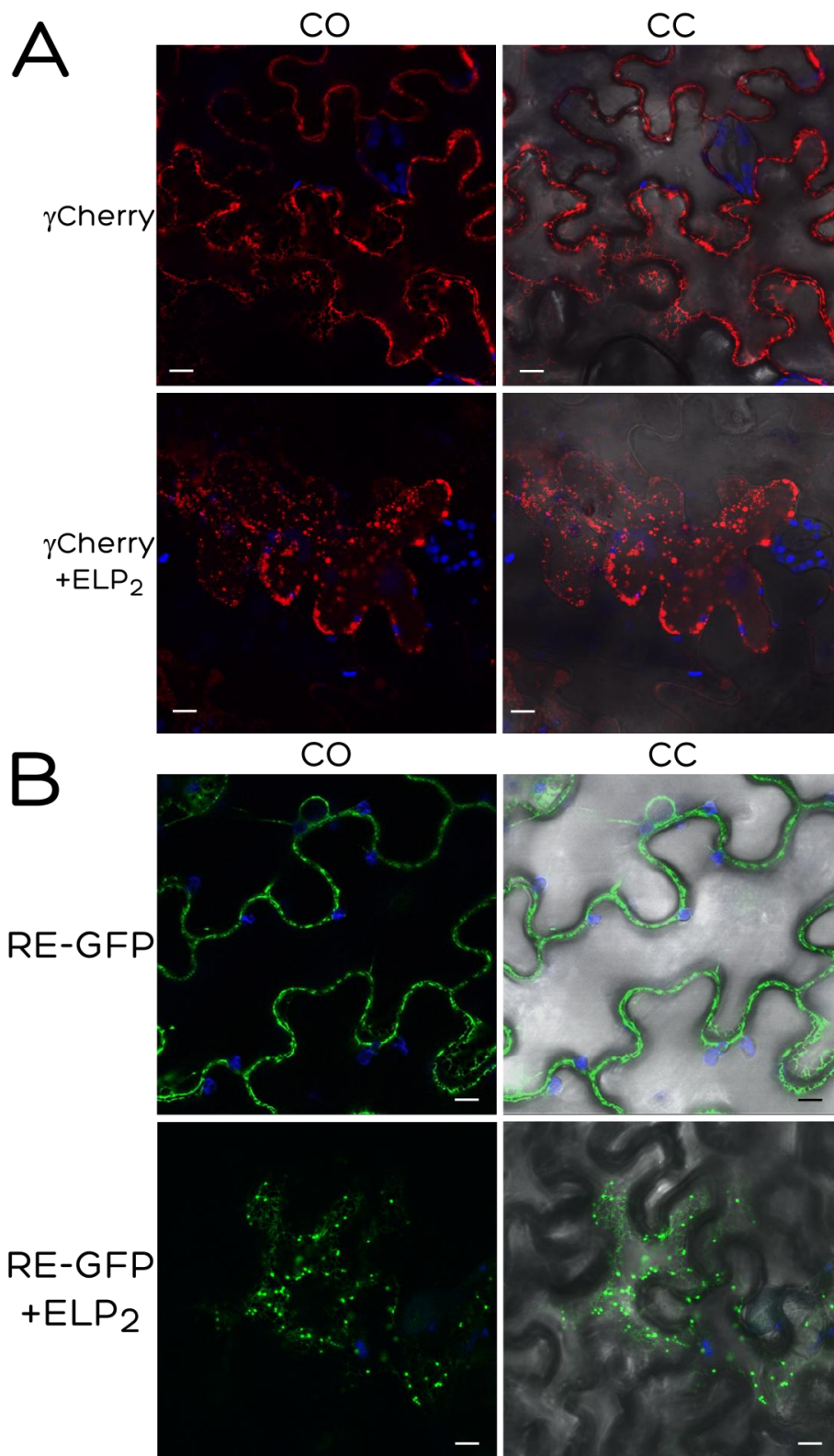


Fig.III.12.Efectos de ELP en la estructura del retículo endoplásmico. Las micrografías fueron obtenidas con un microscopio confocal Leica TCSSP5 observando la cara abaxial de tejido foliar de *N. benthamiana* transformado con las construcciones reporteras γ Cherry (A) y GFP-KDEL (B) con 0,5 unidades de DO600 de cultivo de *A. tumefaciens* para las mismas. La fila superior muestra los controles, en los que el reportero se co-infiltró solamente con el supresor del silenciamiento postranscripcional (PTGS) p19 de TBSV; en la segunda fila de cada panel, además del reportero y el supresor del PTGS, se co-infiltró con la construcción pGWB2(ELP₂). CO: campo oscuro, CC: campo claro. Se muestran los canales de fluorescencia del reportero (rojo o verde) y el de cloroplastos. Escala de la barra: 10 μ m.

resultados ya reportados (Conley y col., 2009b), que indican además que este movimiento es dependiente del sistema de actomiosina que la célula utiliza para el transporte vesicular. El equipo utilizado

permitió la captura de secuencias de imágenes separadas por lapsos de tiempo de 0,1 segundos que dan cuenta de esta movilidad.

IV. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. Conclusiones

En este trabajo se logró la multimerización de un gen sintético que codifica un polímero similar a elastina (ELP) de 186 aminoácidos (36 pentapéptidos más 6 aminoácidos adicionales). Este ELP fue diseñado en base a investigaciones previas sobre la optimización de los parámetros de estos polímeros -fundamentalmente, longitud y composición- para su uso en la recuperación de proteínas recombinantes por ciclado de transición invertida (ITC). En base a esta secuencia aminoacídica, se obtuvo *in silico* una secuencia nucleotídica codificante, a la que se agregó las secuencias que codifican un péptido señal de direccionamiento a vía secretoria, un *tag* de afinidad y una señal de retención en retículo endoplásmico (RE). Se incluyeron en el diseño, además sitios de restricción especiales, necesarios para pasos posteriores en la estrategia. La síntesis y optimización de esta secuencia de ADN se encomendó a una empresa comercial.

El gen sintético ELP₁ fue dimerizado utilizando una estrategia de ligación

recursiva direccional por reconstrucción de plásmido *Re-RDL*. La misma estrategia fue adaptada para lograr la fusión del gen sintético con el gen de la proteína fluorescente roja mCherry, manteniendo los elementos de direccionamiento subcelular y el *tag* de afinidad. Quedó consistentemente demostrada la utilidad del método de *Re-RDL* para construir repeticiones en tándem de secuencias, así como fusiones génicas, con poco o ningún *background*.

Los genes de ELP monomérico y dimérico fueron transferidos satisfactoriamente a vectores binarios para expresión en plantas, los cuales se utilizaron para su expresión transitoria por agroinfiltración en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Conjuntamente, se expresaron dos reporteros fluorescentes y el supresor del silenciamiento génico postranscripcional p19.

La observación por microscopía confocal de los tejidos agroinfiltrados permitió corroborar la capacidad del ELP diméricos de inducir la formación de

cuerpos proteicos (PBs) en el RE y la acumulación en ellos de los dos reporteros fluorescentes. Este efecto, que ya se había reportado para fusiones de proteínas

fluorescentes a ELP, nunca había sido observado *in trans* sobre otras proteínas sobreexpresadas en RE.

2. Perspectivas

En el futuro, y haciendo uso de los resultados alcanzados hasta el momento, se espera poder concretar los siguientes objetivos:

- Analizar cuantitativamente el efecto de los ELP sobre la acumulación de proteínas reporteras en el RE;
- Evaluar la funcionalidad de la construcción PS-mCherry-ELP-His-KDEL, ensayando su expresión transitoria en la misma plataforma, y evaluando acumulación y estabilidad de la proteína de fusión por métodos bioquímicos;
- Utilizar esta última construcción para poner a prueba la utilidad del ELP diseñado en la recuperación de

proteínas de fusión expresadas en plantas;

A más largo plazo, en el marco de la línea de investigación dirigida por la Dra. Petrucci, se proyecta utilizar una fusión entre un ELP multimérico optimizado y el anticuerpo recombinante 2G3, para evaluar su utilidad en el desarrollo de un nuevo método de captura. Éste aprovecharía la transición de fase invertida, propia de los ELP, para “inmunoprecipitar” la enzima transglutaminasa tisular humana (h-tTG), que es específicamente reconocida por 2G3. La h-tTG está implicada en la enfermedad celíaca y su obtención y purificación es de interés, dada su utilidad en el desarrollo de métodos de *screening* de esta enfermedad.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1. Material biológico

iv. Cepas bacterianas

***Escherichia coli* XL-1 Blue**
(Stratagene, La Jolla, EEUU).

Genotipo cromosomal: recA1 endA1
gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac.

Material genético adicional: F' [*proAB*
lacIqZΔM15 Tn10 Tet^r]

Empleada como cepa
electrocompetente para clonado.

***E. coli* TOP-10 (One Shot® Top-10)**
(Life Technologies-Invitrogen, Buenos
Aires, Argentina).

Genotipo: F- *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-
mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG*
recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15
galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻

Empleada como cepa competente para
transformación química, para clonado.
En particular, se usó para seleccionar
transformantes de las reacciones

Gateway® con pGWB2 como vector de
destino, dado que es susceptible a la
toxina codificada por el gen *ccdB*.

***E. coli* DB3.1** (Life Technologies-
Invitrogen, Buenos Aires, Argentina).

Genotipo: F- *gyrA462 endA1 glnV44*
Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB⁻, mB⁻)
ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r)
xyl5 Δleu mtl1.

Utilizada en la propagación del
plásmido pGWB2, puesto que no es
sensible a la acción del gen tóxico
ccdB.

***Agrobacterium tumefaciens* GV3101**

Genotipo: Contiene, integrado en su
cromosoma, secuencias derivadas del
plásmido Ti desarmado pTiC58 y un
gen de resistencia a rifampicina.
Además posee el plásmido helper
pMP90 (pTiC58yΔT-DNA) que confiere
resistencia a gentamicina y provee los
genes *vir*, necesarios para la

transformación del T-DNA dentro de la célula vegetal.

v. Plantas

Nicotiana benthamiana

Se emplearon plantas jóvenes (4 a 5 semanas de vida), cultivadas a 22 °C con fotoperíodo de 16 horas de luz.

2. Vectores Plasmídicos

pUC57(SP-ELP[36x4]-His-KDEL)

(GeneScript, Hong Kong, China), conteniendo el gen sintético ELP₁, provisto por la empresa consignada para la síntesis del mismo.

pCR8/GW/TOPO TA (Life Technologies-Invitrogen, Buenos Aires, Argentina), del sistema de clonado TOPO (del mismo proveedor). Usado como vector de clonado para producir “clones de entrada” para la reacción Gateway.

pGWB2 (Nakagawa, 2002), utilizado como “vector de destino” de la reacción Gateway®, para construir plásmidos binarios para agroinfiltración de *N. benthamiana*.

pGWB2-GFP-KDEL, pGWB2-γCherry (Mangano y col., 2011), utilizados para la expresión de los reporteros fluorescentes GFP-KDEL y γCherry.

pBIN61-p19 (Voinnet y col., 2003), utilizado para la co-expresión del supresor del silenciamiento génico postranscripcional de TBSV p19.

3. Enzimas y kits enzimáticos

i. Enzimas de restricción

BamHI¹, **BglII**², **BstAPI**², **EcoRV**¹, **HindIII**¹, **PflMI**².

Las enzimas fueron comercialmente adquiridas junto con sus correspondientes *buffers* de reacción, a los proveedores siguientes, según se indica:

¹: Life technologies – Invitrogen, Buenos Aires, Argentina.

²: New England Biolabs, Ipswich, EE.UU.

ii. Otras enzimas

Taq ADN polimerasa (Productos BioLógicos, Bernal, Argentina), empleada para dirigir las reacciones de PCR.

Ligasa de fago T4 (T4 Ligase; Promega Corp., Madison, EE.UU.), adquirida con su correspondiente *buffer*.

iii. Kits enzimáticos

LR Clonase® Mix (Life Technologies – Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) utilizado para catalizar la reacción de recombinación Gateway.

Proteinasa K, provista junto con la anterior, para dar punto final a dicha recombinación.

4. Oligonucleótidos

Los siguientes son los oligonucleótidos utilizados como *primers* de PCR en el desarrollo de este trabajo.

Forward: **SP-ELP(nodir)**
BstAPI-mCherry

Reverse: **His-SEKDEL**
mCherry-BamHI

Las correspondientes secuencias se detallan en la Tabla V.1.

5. Medios de cultivo

Luria-Beltrami (LB): Triptona 10 g/l, Extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l. Para variante sólida, se adiciona 16 g/l de ágar-ágar.

YEB: Extracto de carne 13 g/l, extracto de levadura 5 g/l, sacarosa 1 g/l, MgSO₄ 2 mM. Para variante sólida, se adiciona 16 g/l de ágar-ágar.

Supra-Optimal Broth (SOC): Triptona 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂, 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM.

Medio de infiltración (MI): MgCl₂ 10 mM, ácido 2-morfolinoetansulfónico (MES) 10 mM, acetoseringona 100 μM, llevado a pH 5,6 – 5,8 con NaOH 1 N.

Nombre	Secuencia (en sentido 5' – 3')	T _m calculada (°C)
F: SP-ELP	ATGGGATGGTCTTGGATTTTC	62
F: BstAPI-mCherry	GCACGGCGTGCCCATGGTGAGCAAGGGCGAG	64
R: His-SEKDEL	TCATAACTCATCCTTTTCACTG	57
R: mCherry-BamHI	GGATCCGGCCAGCCCGGCCCGCCGGTGGAGTGGCG	73

Tabla V.1. Secuencias de los oligonucleótidos empleados como *primers* de PCR en este trabajo.

6. Soluciones de antibióticos

Todas las soluciones siguientes están concentradas 1000 veces respecto de su concentración final en los medios selectivos utilizados.

Espectinomycin (Life Technologies – Invitrogen): 75 mg/ml en agua bidestilada.

Cloranfenicol (Sigma-Aldrich, Catalog. # C0378-5G): 30 mg/ml en etanol 70%.

Gentamicina (Sigma-Aldrich, Catalog. # G6896): 50 mg/ml en agua bidestilada.

Kanamycin (Sigma-Aldrich, Catalog. # K4378): 50 mg/ml en agua bidestilada.

7. Herramientas Bioinformáticas

Se utilizó el software CloneManager suite 9 (v9.2) para el diseño de las estrategias de clonado, así como para la predicción de los tamaños de fragmentos producidos por digestión enzimática o amplificación por *PCR*.

2. Métodos

1. Técnicas de ADN recombinante

i. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizó un termociclador Gradient MyCycler™ (Bio-Rad, San Francisco, EE.UU.). Se prepararon mezclas de reacción de 10 µL (para el caso de las *colony-PCR*) o 30 µL (para la *PCR* preparativa de la reacción TOPO). El ciclo de PCR utilizado se describe en la Tabla V.2.

Para la variante *hot-start*, manteniendo las proporciones, se prepararon mezclas de reacción sin *Taq*-polimerasa y se llevó a cabo un ciclo de desnaturalización inicial por 10 minutos a

94 °C. Recién una vez finalizado este tratamiento se agregó la enzima y se dejó proseguir el ciclo, según se detalló para la *PCR* original.

ii. Colony-PCR

Una mezcla de *PCR* preparada como se describió en el punto anterior, es fraccionada en tantos tubos como colonias se desee chequear (más la cantidad de controles necesarios). A partir del cultivo en placa que se desea chequear, se pica una colonia a la vez con un ansa o *tip* estéril y se transfieren las células, por un lado, a una de las fracciones de mezcla, y por el otro a una nueva placa de cultivo. La *PCR* prosigue del modo ya descrito.

Desnaturalización inicial	94 °C	4:00* min	
Desnaturalización	94 °C	0:15 min	} × <i>n</i> ciclos
Apareamiento de <i>primers</i>	T _H	0:15 min	
Extensión	72 °C	t _e	
Extensión final	72 °C	10:00 min	
Enfriamiento	4 °C	10:00 min	

Tabla V.2. Ciclo de PCR. Como temperatura de hibridación (T_H) se usó la T_m calculada menor entre las del par de primers de cada reacción. Los tiempos de extensión (t_e) se calcularon utilizando la relación aproximada de 1 minuto por cada 1000 pares de bases del fragmento a amplificar (dada por la procesividad de la *Taq*-polimerasa).

*El tiempo de desnaturalización inicial es diferente en el caso de las *hot start* PCR.

iii. Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de ADN plasmídico, digestiones enzimáticas de plásmidos y productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa 1%. Los geles se prepararon disolviendo 1% p/v de agarosa en buffer TAE 1X (Tris 40mM, ácido acético 20mM, EDTA 1mM, pH = 8). Se adicionó bromuro de etidio para permitir el revelado por iluminación con luz ultravioleta (UV). Las muestras de ADN fueron mezcladas con 1/4 de volumen de buffer de siembra de ADN 4X (glicerol 80%, azul de bromofenol 0,25%, naranja G 0,25%, xileno ciano 0,25%, buffer TAE 5X) antes de ser sembradas.

Las corridas electroforéticas se desarrollaron en *buffer* TAE 1X a voltaje constante (90 V). Para visualizar las bandas de ácidos nucleicos se utilizó un transiluminador UV (UVP, Upland, California). Para la digitalización de los geles se utilizó una cámara Kodak Z 712 IS (7.1 Megapixels) con filtro naranja.

iv. Purificación de fragmentos de ADN

Para purificar fragmentos de PCR o de digestiones de plásmidos a partir de geles de agarosa se utilizó el kit comercial HiYield Gel / PCR DNA Mini Kit (BioAmerica Inc, Miami, EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El mismo kit fue utilizado para eliminar las enzimas de restricción luego de las digestiones enzimáticas realizadas o para hacer cambios de *buffers* entre pasos de digestiones secuenciales.

v. Extracción de ADN plasmídico (miniprep)

Se utilizó el kit comercial Wizard Plus SV Minipreps (Promega Corporation, Madison, EEUU), según las recomendaciones del fabricante. Para plásmidos de alta copia (pUC57, pCR 2.1 y pCR8) se partió de cultivos saturados de 5 ml. Para los plásmidos de baja copia (pGWB2) se partió de cultivos saturados de 10ml.

vi. Cuantificación de ADN en solución

Se utilizó espectrofotómetro Nanodrop (gentilmente facilitado por el equipo de investigación del Dr. Lagares – IBBM, Universidad Nacional de La Plata), acoplado una computadora provista del *software* correspondiente. Típicamente, las soluciones obtenidas por el método de miniprep descripto arrojaron valores de ~300 ng ADN/ μ L para soluciones de plásmidos derivados de pCR8 y de ~80 ng ADN/ μ L para los de pGWB2.

vii. Digestiones de ADN con enzimas de restricción

Para calcular estimativamente las proporciones de cada reactivo se tuvieron en cuenta los datos de cuantificación de ADN (punto anterior), de manera de que al armar las mezclas de reacción las concentraciones fueran de ~50 ng ADN/ μ L y ~1 UE/ μ L. En todas las digestiones se incubó a la temperatura óptima de la enzima (37 °C para todas las enzimas empleadas, excepto para *Bst*API, cuya T_{opt} es de 60 °C). Los tiempos de reacción usados fueron de entre 1 h y 3 h (para digestiones exhaustivas).

Las condiciones de pH y concentración de cofactores se establecieron por el uso de los *buffers* provistos comercialmente junto con las enzimas.

En particular, para la estrategia de *Re-RDL*, se digirió un volumen de 10 µL de preparación plasmídica en 30 µL totales de mezcla de reacción, con *PfI*MI/*Xho*I y *Bgl*II/*Xho*I, por separado. Dada la incompatibilidad de los buffers requeridos para las actividades de *PfI*MI y *Bgl*II respecto del necesario para *Xho*I, fue necesario realizar las digestiones en pasos secuenciales: en primer lugar se armó una mezcla de reacción para digerir con *Bgl*II en solución buffer NEB3® (New England Biolabs, Ipswich, EE.UU.) y otra para digerir con *PfI*MI en solución buffer NEB3 suplementada con seroalbúmina bovina (*BSA*), según recomendación del proveedor de la enzima. Una vez agregada la alícuota de plásmido en la cantidad anteriormente indicada, se incubó la mezcla en estufa a 37 °C por 2 h. Transcurrida la primera digestión, se aisló el ADN de la mezcla por medio del kit comercial HiYield™Gel/PCR DNA Mini Kit (BioAmerica Inc., Miami, EE.UU.) eluyéndose el mismo en 20 µL de agua libre de nucleasas. Cada muestra fue luego llevada a 30 µL totales de mezcla de reacción en buffer REACT2® (Life Technologies - Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) para la digestión de ambas con *Xho*I. La digestión se dejó transcurrir a 37 °C por otras 2 h.

Un procedimiento equivalente se llevó a cabo para solucionar las incompatibilidades de condiciones en la doble digestión con *Bst*API y *Bam*HI del plásmido pCR8(mCherry).

viii. Desfosforilación de ADN

Se empleó la enzima fosfatasa alcalina de camarón (SAP; Promega Corp., Madison, EE.UU.). Una alícuota de solución de plásmido linealizada fue incubada con 2 U de SAP en buffer SAP 1X durante 15 minutos a 37 °C, siguiendo la recomendación del fabricante. A continuación se incubó durante 15 minutos a 65 °C para inactivar la enzima y se centrifugó durante 3 minutos a 13.000rpm (16.300 g). El producto fue purificado usando el protocolo descripto anteriormente.

ix. Ligación de ADN

Se utilizó la ligasa de fago T4 (T4 *Ligase*; Promega Corp., Madison, EE.UU.) en *buffer* provisto por el fabricante. La reacción se dejó transcurrir a 4 °C durante una noche.

x. Clonado TOPO

Se utilizó el *kit* comercial pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (Life Technologies – Invitrogen, Buenos Aires, Argentina). La mezcla para la reacción consistió de 0,5 µL de solución salina (*Salt Solution*, provista por el fabricante del kit: 1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂), 0,5 µL de vector pCR8/GW/TOPO (10ng/µl) y 2 µL de producto de PCR, previamente purificado a partir de un gel de electroforesis de agarosa. La mezcla se incubó *overnight* a temperatura ambiente.

xi. Reacción Gateway (LR clonadas)

En cada caso, se preparó la mezcla de reacción a partir de los siguientes volúmenes: 0,5 µL del “clon de entrada”, 1 µL del “vector de destino” y 0,5 µL de la solución LR Clonase® Mix II (Life Technologies – Invitrogen, Buenos Aires, Argentina). La reacción se dejó transcurrir toda la noche a temperatura ambiente y se detuvo luego aplicando 1 µL de la solución de Proteinasa K, provista en el *kit*.

2. Microbiología

i. Preparación de stock de *E. coli* XL-1 Blue electrocompetentes

Partiendo de una colonia aislada de bacteria, previamente cultivada en medio LB sólido suplementado con tetraciclina, se inoculan bacterias en medio LB líquido y se cultivan durante una noche a 37 °C y 200 rpm de agitación. A continuación, se diluye el cultivo 100 veces en medio LB y se incubó a 37 °C y 200 rpm de agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5. Una vez alcanzado ese valor, se enfría el cultivo durante 15 minutos a 0 °C y a partir de este momento se trabaja siempre en hielo. Se centrifuga todo el cultivo durante 5 minutos a 5.000 rpm (3836 g, rotor Beckman JA14) a 4°C y se descartó el sobrenadante. Las bacterias sedimentadas son resuspendidas en glicerol 10%, estéril, a 4 °C, y

centrifugadas nuevamente. Se repite este paso de lavado dos veces, utilizando 1 y 0,5 volúmenes de glicerol respecto del volumen de cultivo original. Finalmente, las bacterias se resuspenden en glicerol 10% en un volumen que es 0,01 veces el volumen de cultivo original. La suspensión resultante se fracciona en viales de a 150 μ L y se congela en N₂ líquido. Las fracciones de bacterias competentes se conservan a -80 °C hasta el momento de su uso.

ii. Preparación de stock de *A. tumefaciens* GV3101 electrocompetentes

Se inocula 1 ml de *A. tumefaciens* GV3101 provenientes de un cultivo saturado en 100 ml de medio YEB conteniendo rifampicina 20 μ g/mL y gentamicina 50 μ g/mL y se deja crecer hasta una densidad óptica DO₆₀₀ de 0,5 - 0,7. Las bacterias se centrifugan a 4000 rpm (2455g, rotor JA-14 Beckman) por 5 minutos a 4 °C y se descarta el sobrenadante. El precipitado se lava con 1; 0,5; 0,2 y 0,2 volúmenes –respecto del cultivo original- de glicerol 10 % estéril a 4 °C. Finalmente, las bacterias son resuspendidas en 0,01 volúmenes (respecto del cultivo original) y se alicuotaron para su conservación a -80 °C hasta el momento de su uso.

iii. Transformación de bacterias por electroporación

Sobre un volumen de 100 μ L de bacterias electrocompetentes (tanto para *E. coli* XL-1 Blue como para *A. tumefaciens* GV 3101) se adiciona 1 μ L de la solución plasmídica a electroporarse. Esta suspensión se introduce en una cubeta de electroporación y se le aplica un pulso eléctrico mediante electroporador Bio-Rad Gene Pulser (Bio-Rad, California, EEUU; condiciones de la electroporación: capacitancia 25 μ F, voltaje 2,5 kV, resistencia 200 Ω), para luego reposarse 1 minuto en hielo y transferirse después a un vial conteniendo medio SOC previamente entibiado a 37 °C. El cultivo se deja recuperar por 1 h a 37 °C agitado a 200 rpm y es finalmente plaqueado en medio sólido selectivo (LB para *E. coli*, YEB para *A. tumefaciens*). Las colonias resultantes se comprueban al día

siguiente por el método ya descrito de *colony-PCR*.

iv. Transformación química de bacterias

Se toman 17 μ L de suspensión de *E. coli* TOP-10 competentes químicas (Life Technologies – Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) desde *stock* conservado a -80 °C. La suspensión se descongela en hielo hasta los 0 °C y se le aplica 1 μ L de la solución de plásmido, se mezcla suavemente y se somete a incubaciones: a 0 °C por 30 min, luego a 42 °C por 1 min y finalmente a 0 °C por 2 min. Se agrega sobre las bacterias medio SOC previamente entibiado a 37 °C y se dejan recuperar por 1 h a 37 °C. Finalmente se plaquean en medio LB sólido selectivo. Las colonias resultantes se comprueban al día siguiente por el método ya descrito de *colony-PCR*.

3. Expresión transitoria en plantas

i. Agroinfiltración

Se parte desde una colonia aislada o de un cultivo *stock* guardado a -80°C conteniendo la construcción de interés. A partir de cualquiera de ellos se realizan dos cultivos *overnight* sucesivos en 5 ml de medio YEB selectivo líquido, a 28 °C y 150 rpm de agitación, en oscuridad. El medio de cultivo se suplementó con gentamicina, además del antibiótico necesario para la selección de las bacterias con plásmido binario.

Se le agrega al cultivo acetosiringona (Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina) a una concentración final de 100 μ M y se cultivó por 3 horas más a 28°C, con 150 rpm de agitación, en oscuridad. Esta sustancia induce la expresión de los genes “de virulencia” necesarios para la transferencia del T-DNA a la célula de la planta.

Se mide la DO₆₀₀ del cultivo, como parámetro de la densidad de bacterias que posee. Se centrifuga en un vial de 1,5 mL el cultivo por un minuto a 10.000 rpm (9.200 g) y se resuspende en medio de infiltración, de manera de obtener una “DO₆₀₀ final” determinada. En el caso de querer ensayarse co-infiltraciones de distintas construcciones, en esta disolución se tienen en cuenta los aportes

en volumen del agregado de las suspensiones de las distintas bacterias.

Las suspensiones logradas se usan para agroinfiltrar plantas de *N. benthamiana* jóvenes, a las que se ha suspendido el riego 36 h antes de la agroinfiltración. Para ello, se toma suspensión de *Agrobacterium* con una jeringa de 1 ml sin aguja, se coloca la punta de la misma en la cara abaxial de una hoja y se presiona con el émbolo para infiltrar el cultivo entre la cutícula y la epidermis de la hoja.

Las plantas agroinfiltradas se mantuvieron en cámara de cultivo.

ii. Observación al microscopio estéreo de disección fluorescente

Se utilizó el microscopio estéreo de disección fluorescente modelo UV Leica MZ10F con filtros GFP (excitación 470/40nm, emisión

525/50 nm) y DsRed (excitación 545/30nm , emisión 620/60 nm) acoplado a una cámara CCD refrigerada (Leica DFC 490). Las observaciones se realizaron *in vivo* sobre la cara abaxial de la hoja.

iii. Microscopía confocal

Los estudios de microscopía de fluorescencia confocal se realizaron utilizando un Microscopio Invertido DMI 6000 CS motorizado acoplado a un Láser Confocal Espectral (CLSM) Leica TCS SP5 equipado con 7 líneas de láser, AOTF (Acousto-Optic Tunable Filter), AOBS (Acousto-Optical Beam Splitter) y sistema de barrido (Tandem-scanning system SP5). Las estructuras subcelulares fueron visualizadas usando el objetivo de inmersión en aceite (63X). mCherry fue excitada a 543 nm y detectada en el rango 570-630 nm. GFP fue excitada a 488 nm y detectada en el rango 498-591 nm.

VI. APÉNDICE

Secuencia Nucleotídica Optimizada del Gen Sintético ELP₁

Péptido señal

ATGGGATGGTCTTGATTTCCTTTTCTTATTGCTTCTCTCTGGTGCTGCTGGGTACCCCA

ELP

TGGG**CCACGGCGTGG**GCGTGCCTGGAGTTGGTGTGCCTGGTGTGGAGTGCCTGGTGTGGGA
PfMI

...ELP...

GTTCCAGGAGTGGGTGTTCTGGTGTGGAGTTCCTGGAGTTGGAGTGCCTGGTTTTGGAGT

...ELP...

TCCAGGAGTGGGTGTTCTGGAGTGGGTGTTCTGGAGTGGGAGTTCCTGGTGTGGAGTGC

...ELP...

CTGGAGTGGGTGTGCCTGGAGTTGGAGTTCCTGGTGTGGGTGTGCCTGGTGTGGGAGTGCCT

...ELP...

GGTTTTCGGTGTGCCTGGAGTGGGAGTTCCTGGTGTGGGAGTGCCAGGAGTGGGAGTGCCTGG

...ELP...

AGTGGGAGTGCCTGGTGTGGGTGTTCTGGTGTGGTGTTCCTGGAGTTGGTGTTCAGGAG

...ELP...

TGGGTGTGCCTGGTTTTGGAGTTCCTGGTGTGGTGTCCCTGGAGTGGGTGTTCTGGGGTT

...ELP...

GGTGTCCCTGGTGTGGGAGTCCCTGGTGTGGTGTGCCTGGAGTTGGAGTGCCTGGAGTTGG

...ELP

TGTGCCAGGTGTGGGTGTTCTGGTTTTGGAGTGCCTGGAGTTGGAGTGCCTGGTGTGGTG

HisTag

SEKDEL

GAGT**GCCGGGCTGGCGGATCC**GCACCACCACCACCACAGTGAAAAGGATGAGTTATGA
BglI *BamHI*

Secuencia Aminoacídica Completa traducida desde el Gen Sintético ELP₁

extremo N-terminal
extremo C-terminal

```

      Péptido Señal          ELP
-----
MGWSWIFLFLLLLSGAAGYPMGHGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVG
-----
VPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGV
-----
VPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGV
-----
                                         HisTag  KDEL
VPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGV
  
```

Secuencia Aminoacídica Completa traducida desde la construcción ELP2

extremo N-terminal
extremo C-terminal

```

      Péptido Señal          ELP1
-----
MGWSWIFLFLLLLSGAAGYPMGHGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVG
-----
VPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGV
-----
VPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGV
-----
                                         ELP2
VPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGV
-----
GVPFGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGV
-----
GVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGV
-----
                                         HisTag  KDEL
GVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGV
  
```

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad P, Ashraf M, Younis M, Hu X, Kumar A, Akram NA, Al-Qurainy F** (2011) Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnology Advances*. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.006
- Benchabane M, Goulet C, Rivard D, Faye L, Gomord V, Michaud D** (2008) Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnology Journal* **6**: 633-648
- Castilho A, Strasser R, Stadlmann J, Grass J, Jez J, Gattinger P, Kunert R, Quendler H, Pabst M, Leonard R, et al** (2010) In Planta Protein Sialylation through Overexpression of the Respective Mammalian Pathway * □. **285**: 15923–15930
- Christensen T, Amiram M, Dagher S, Trabbic-Carlson K, Shamji MF, Setton L a, Chilkoti A** (2009) Fusion order controls expression level and activity of elastin-like polypeptide fusion proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society* **18**: 1377–87
- Conley AJ, Joensuu JJ, Jevnikar AM, Menassa R, Brandle JE** (2009a) Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants. *Biotechnology and Bioengineering* **103**: 562–573
- Conley AJ, Joensuu JJ, Menassa R, Brandle JE** (2009b) Induction of protein body formation in plant leaves by elastin-like polypeptide fusions. *BMC Biology* **7**: 48
- D'Aoust M, Couture MM, Charland N, TrÃ©panier S, Landry N, Ors F, VÃ©zina L** (2010) The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: A rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnology Journal* **8**: 607-619
- Floss DM, Mockey M, Zanella G, Brosnon D, Diogon M, Frutos R, Bruel T, Rodrigues V, Garzon E, Chevalyere C, et al** (2010) Expression and Immunogenicity of the Mycobacterial Ag85B/ESAT-6 Antigens Produced in Transgenic Plants by Elastin-Like Peptide Fusion Strategy. *Journal of biomedicine biotechnology* **2010**: 274346
- Floss DM, Sack M, Arcalis E, Stadlmann J, Quendler H, Rademacher T, Stoger E, Scheller J, Fischer R, Conrad U** (2009) Influence of elastin-like peptide fusions on the quantity and quality of a tobacco-derived human immunodeficiency virus-neutralizing antibody. *Plant Biotechnology Journal* **7**: 899–913
- Giritch A, Marillonnet S, Engler C, Van Eldik G, Botterman J, Klimyuk V, Gleba Y** (2006) Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 14701-14706
- Goulet C, Khalf M, Sainsbury F, D'Aoust MA, Michaud D** (2012) A protease activity-depleted environment for heterologous proteins migrating towards the leaf cell apoplast. *Plant Biotechnology Journal* **10**: 83-94
- Herman EM, Larkins BA** (1999) Protein Storage Bodies and Vacuoles. *Plant Cell* **11**: 601–613
- Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, Beuhner N, Arntzen CJ, Thanavala Y, Mason HSU-hwscsaBT-D-Kbebbadc** (2005) Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine* **23**: 1851-1858

- Koprivova A, Stemmer C, Altmann F, Hoffmann A, Kopriva S, Gorr G, Reski R, Decker EL** (2004) Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans. *Plant biotechnology journal* **2**: 517–23
- Lim DW, Trabbic-Carlson K, Mackay JA, Chilkoti A** (2007) Improved non-chromatographic purification of a recombinant protein by cationic elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules* **8**: 1417–24
- Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y** (2005) Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology* **23**: 718-723
- Maxmen, A** (2012) Drug-making plant blooms. *Nature* **484**: 160
- Mcdaniel JR, Mackay JA, Garcı F** (2010) Recursive Directional Ligation by Plasmid Reconstruction Allows Rapid and Seamless Cloning of Oligomeric Genes. *Biomacromolecules* **11**: 944–952
- Meyer DE, Chilkoti A** (1999) Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nat Biotech* **17**: 1112–1115
- Meyer DE, Chilkoti A** (2002a) Protein Purification by Inverse Transition Cycling. *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 329–344
- Meyer DE, Chilkoti A** (1997) Protein Purification by Inverse Transition Cycling. 329–344
- Meyer DE, Chilkoti A** (2002b) Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: examples from the elastin-like polypeptide system. *Biomacromolecules* **3**: 357–67
- Nakagawa T** (2002) GATEWAY Binary Vector (pGWB) manual.
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T** (2007) Development of Series of Gateway Binary Vectors, pGWBs, for Realizing Efficient Construction of Fusion Genes for Plant Transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **104**: 34–41
- Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV** (2011) Advances in plant molecular farming. *Biotechnology advances* **29**: 210–22
- Paul M, Ma JK-C** (2011) Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms. *Biotechnology and applied biochemistry* **58**: 58–67
- Phoolcharoen W, Bhoo SH, Lai H, Ma J, Arntzen CJ, Chen Q, Mason HS** (2012) Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnology Journal* **9**: 807-816
- Scheller J, Leps M, Conrad U** (2006) Forcing single-chain variable fragment production in tobacco seeds by fusion to elastin-like polypeptides. *Plant biotechnology journal* **4**: 243–9
- Shoji Y, Farrance CE, Bautista J, Bi H, Musiychuk K, Horsey A, Park H, Jaje J, Green BJ, Shamloul M, Sharma S, Chichester JA, Mett V, Yusibov V** (2012) A plant-based system for rapid production of influenza vaccine antigens. *Influenza and other Respiratory Viruses* **6**: 204-210

- Silhavy D, Molnár A, Lucioli A, Szittyá G, Hornyik C, Tavazza M, Burgyán J** (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *The EMBO journal* **21**: 3070–80
- Spök A** (2007) Molecular farming on the rise - GMO regulators still walking a tightrope. *Trends in Biotechnology* **25**: 74-82
- Spök AA, Karner S, Stein EAJ, Rodríguez-cerezo E** (2008) Plant Molecular Farming Opportunities and Challenges. doi: 10.2791/30861
- Streatfield SJ** (2007) Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant biotechnology journal* **5**: 2–15
- Trabbic-carlson K, Liu LI, Kim B, Chilkoti A** (2004) Expression and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* : Comparison of an elastin-like polypeptide fusion with an oligohistidine fusion. 3274–3284
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R** (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in biotechnology* **21**: 570–8
- Twyman RM, Schillberg S, Fischer R** (2005) Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opinion on Emerging Drugs* **10**: 185-218
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D** (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **33**: 949–56
- Whaley KJ, Hiatt A, Zeitlin L** (2011) Emerging antibody products and Nicotiana manufacturing. *Human Vaccines* **7**: 349-356
- Wilken LR, Nikolov ZL** (2011) Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnology advances*. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.020
- Wilken LR, Nikolov ZL** (2012) Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnology Advances* **30**: 419-433
- Xu J, Dolan MC, Medrano G, Cramer CL, Weathers PJ** (2011) Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology advances*. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.020