



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

**Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de
Alimentos**
CIDCA-UNLP-CONICET

**“DIRECCIONAMIENTO DE
PROTEÍNAS
RECOMBINANTES A VACUOLAS DE
RESERVA”**

Tesis Doctoral

La Plata, 2010

Lic. Jorge Fabricio Lareu

Directora: Dra Silvana Petruccelli

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, UNLP-CONICET CCT La Plata), bajo la dirección de la Dra. Silvana Petruccelli.
La Plata, 2010.

PUBLICACIONES DEL PRESENTE TRABAJO

- ✿ **Petruccelli, S., Otegui, M.S., Lareu, F., Tran Dinh, O., Fitchette, A.C., Circosta, A., Rumbo, M., Bardor, M., Carcamo, R., Gomord, V. and Beachy, R.N.** (2006) A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds. *Plant Biotechnology Journal*, **4**, 511-527.

- ✿ **Petruccelli, S., Molina, M.I., Lareu, F.J., Circosta, A.** (2007). Two short sequences from amaranth 11S globulin are sufficient to target green fluorescent protein and beta-glucuronidase to vacuoles. *Plant Physiol Biochem.* ; **45(6-7)**:400-409.



A mis Hijos y Esposa.



AGRADECIMIENTOS

Quisiera aprovechar en estas primeras páginas para expresar mi más sincera gratitud a todas las personas, investigadores, profesores, compañeros y amigos, a quienes me ayudaron y apoyaron en el transcurso de esta tesis. Por el deseo de superación y el incentivo en épocas de dificultades, comunes en este trabajo y en la vida cotidiana.

Mi reconocimiento a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por otorgarme la posibilidad de realizar el Doctorado en Ciencias en el ámbito de la Institución; al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por la beca otorgada y, al Centro de Investigación y Desarrollo en Biotecnología de Alimentos por brindarme un lugar y los recursos necesarios para llevar a cabo este trabajo.

Mi mayor agradecimiento a la Dra. Silvana Petruccelli, no solo por la oportunidad de realizar la tesis, sino por su dirección y apoyo incondicional en todos estos años. Gracias por guiarme y aconsejarme, mostrando siempre disposición y entusiasmo a la hora de emprender cosas nuevas. Por la calidad humana y los invaluable aportes a mi formación. Por las tantas veces que quedaron de lado cosas laborales, e incluso personales para poder darme una mano; por el compromiso y la voluntad. Mi mayor gratitud por la tolerancia y la comprensión, particularmente en estos últimos tiempos. Gracias, porque no solo has sido directora en este trabajo, sino además compañera y amiga, aconsejando y brindando apoyo en lo personal, lo que demuestra una gran persona, con respeto y cariño hacia uno. Muchas gracias Silvana.

Mi agradecimiento a la gente del CIDCA en general, porque directa o indirectamente han aportado para que termine este trabajo. A los Directivos, los investigadores, Profesionales, Técnicos y Becarios.

Gracias en particular a la gente de Proteínas, a Cristina por su estimulante crítica y su sinceridad; a Nora, Adriana M., a Adriana S. por la simpatía. A Claudio por

contagiar alegría y Aldo por el constante buen humor, con quien no solo comparto la pasión xeneize sino también, la frustrada y negada incursión cinematográfica. A los chicos, Paula, Ale, Pablo, Jorge, Francisco, Agustín, Noe, Ceci, Silvina, Cami, Bruno, Coqui, Renata, a los nuevos, a los pasantes. Aquellos que dan “una vuelta cada tanto” como Mary, Daniel, Victoria, Alejandra y Lili; o al los que tomaron otros rumbos, Gaby, Cachito, Isa, Lorenza, Sara, por los innumerables mates, vivencias, anécdotas y el montón de cosas, laborales y no tanto, que vivimos en el día a día tratando de pasarla lo mejor posible, convirtiendo la tesis en solo una pequeñez de las cosas lindas compartidas.

No puedo dejar de agradecer a la gente de otros grupos, sin poder mencionarlos porque seguro me olvidaré de muchos, pero con quienes tantas veces compartimos no solo equipos, sino además entre tantas cosas, las gratificantes charlas de pasillo. A Paula y sus “confortitos” que salvaron el mate de la tarde. A los chicos del Anexo del cual “soy anexo”, Ale, Martín, Vanesa, Jimena, Sandro, Estefanía, Olivia, Anabela, Nicolás, Analía, en especial por las incontadas charlas y vivencias en el almuerzo. A Dario, con quien hoy puedo contar no solo como un compañero sino como un gran amigo.

Gracias a aquellos que ayudaron a remar desde afuera, la gente del IBBM, Leticia, Carolina, Rubén, JPG y en especial a los chicos de VV, Carina, Cecilia, Agustina y Gabriel; a Edu y Mari (aunque estén del otro lado del charco) y siempre, a Laura, por la fuerza y aliento, por compartir además los consejos para con mis niños. A la gente de las distintas cátedras en las cuales he estado, porque aportaron entre tantas cosas a formarme como docente. A aquellos que están un poco más allá de “la 60” y se hacía largo ir caminando, por las tantas veces que aportaron reactivos, experiencias, semillas, plantas y hasta unos mates, gracias Facu, Dana y Juan José.

A todos por hacer de esta tesis no solo un trabajo, sino una gran experiencia de vida.

A mi Familia, imposible de nombrarlos a todos porque soy parte de cada uno de ellos. Desde mis comienzos apoyándome en la decisión de estudiar, esforzándose para que pueda alcanzar mis logros, por tolerar y comprender las tantas veces que no pude viajar a verlos, insistiendo infinitamente con: ¿cuándo van a venir?. En especial a mis

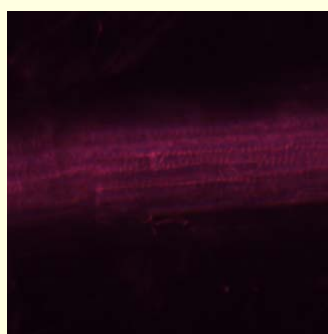
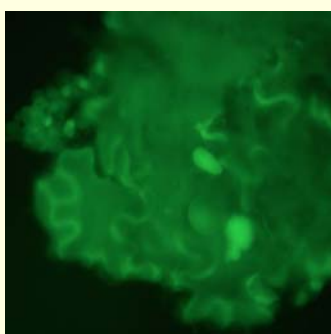
padres, que incondicionalmente “siempre y en todo, están” y a mis hermanos, por la complicidad y la yunta que mantenemos desde chicos. A aquellos que se fueron y a los que aparecieron en este camino de ir formando nuestras propias familias, mis cuñadas y sobrinitos, a Inés y Federico por permitirme ser parte de ellos y querer ser parte de mí.

Por último, mi agradecimiento especial a quien hoy es mi vida, a quien me ha dado la oportunidad en algo tan importante como es el espíritu de crecer, de ser amado, de ser todo en esta vida, por estar siempre a mi lado. Gracias, porque hace un par de añitos, llegaron a nuestras vida Nehuén y Wanelen, forjando el camino hacia la felicidad; a ellos, por recordarme y enseñarme entre tantas cosas, lo básico de una vida simple y hermosa que es comer, dormir y sonreír, siempre sonreír; los quiero. Gracias Ariana por darme la oportunidad de crecer juntos, y en especial en esto que es ser padres. TE AMO.

MUCHAS GRACIAS.



INDICE



INDICE

PUBLICACIONES DEL PRESENTE TRABAJO	II
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE	VII
ABREVIATURAS	XII
INTRODUCCIÓN GENERAL	1-31
1. Las plantas como biorreactores para la producción de proteínas de interés	1
1.1 Visión general de <i>Molecular Farming</i>	1
1.2 Las plantas como sistemas de expresión para la síntesis de Anticuerpos	5
1.3. Estrategias generales que pueden emplearse para incrementar los niveles de acumulación de proteínas recombinantes en plantas	8
1.3.1 El incremento en la eficiencia de los procesos de transcripción y/o traducción como estrategia para incrementar los niveles de acumulación de la proteína de interés	8
1.3.2 El incremento en la eficiencia de los procesos co y post-traduccionales como estrategia para generar una proteína modificada adecuadamente y para incrementar la cantidad de producto con actividad biológica	11
1.3.3 El direccionamiento de la proteína recombinante a distintos compartimientos como estrategia para incrementar los niveles de acumulación	12
2. Descripción general de la vía secretoria en plantas	15
2.1 Los componentes de la vía secretoria	15
2.2. El transporte de moléculas en la vía secretoria	18
2.3 Otras proteínas importantes en la vía secretoria	20
3. N-glicosilación en plantas	22

3.1. Maduración de N-glicanos dentro de la vía secretoria.....	22
3.2. El impacto de la N-glicosilación en el plegado y actividad de las proteínas.....	25
3.3 Alergenicidad de glicanos de plantas.....	26
4. La semilla como órgano de almacenamiento.....	27
4.1 Estructura general de las semillas.....	27
4.2 Proteínas de almacenamiento de semillas.....	29
4.2.1 Clasificación de proteínas.....	29
4.2.2 Tráfico y deposición de proteínas de reserva en semillas.....	30

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Objetivos Generales.....	32
Objetivos Específicos.....	33

MATERIALES Y MÉTODOS.....

1. Materiales.....	34-37
1.1 Reactivos químicos.....	34
1.2 Medios de cultivos para bacterias.....	34
1.3 Soluciones de antibióticos empleadas.....	35
1.4 Cepas bacterianas.....	35
1.5 Vectores plasmídicos utilizados.....	35
1.6 Primers utilizados.....	36
1.7 Proteínas fluorescentes utilizadas.....	37
2. Metodologías.....	37-49
2.1 Minipreparación de DNA plasmídico.....	37
2.2 Digestión con enzimas de restricción.....	38
2.3 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.....	38
2.4 Subclonado de las construcciones doble reportero al vector binario.....	38
2.5 Extracción de DNA de tejido vegetal para PCR.....	39
2.6 Extracción de proteínas totales desde hojas.....	40
2.7 Extracción y purificación de anticuerpos de plantas.....	40
2.8 Reacción de PCR.....	41
2.9 Electroforesis.....	41-42

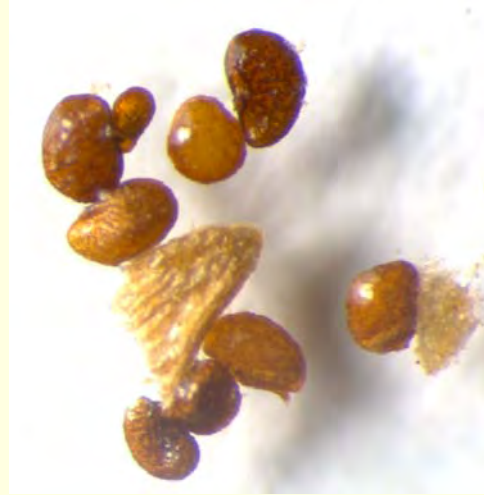
2.9.1 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).....	41
2.9.2 Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa 0.8% con bromuro de etidio.....	42
2.10 Tinción con el colorante azul de Coomassie.....	42
2.11 Western blot.....	42-43
2.11.1 Electrotransferencia.....	42
2.11.2 Tinción reversible con colorante Rojo Ponceau.....	42
2.11.3 Detección inmunológica y afinodetección de las proteínas.....	43
2.12 ELISA Sándwich.....	43
2.13 Reacción histoquímica para GUS.....	44
2.14 Obtención de cepas <i>Agrobacterium tumefaciens</i> recombinantes.....	44
2.14.1 Obtención de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> electrocompetentes.....	44
2.14.2 Transformación por electroporación de cepas <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	44
2.15 Agroinfiltración de hojas de <i>N. tabacum</i> (expresión transitoria).....	45
2.16 Transformación de discos de hojas de tabaco mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (expresión estable).....	45
2.17 Transformación transitoria de protoplastos T87 de Arabidopsis.....	47
2.18 Tinción con rojo neutro.....	47
2.19 Microscopías.....	48-49
2.19.1 Microscopía confocal de escaneo láser en protoplastos T87 de Arabidopsis t.....	48
2.19.2 Microscopía confocal de escaneo láser en plantas de <i>Nicotiana tabacum</i>	48
2.19.3 Inmunomicroscopía.....	49
CAPITULO I: “EXPRESION DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL FUSIONADO A LA SECUENCIA KDEL EN PLANTAS DE <i>Nicotiana tabacum</i> ”.....	50-67
I.1 Introducción.....	50
I.2 Resultados y discusión.....	52
I.2.1. Efecto de la secuencia KDEL sobre la acumulación del anticuerpo 14D9 purificado desde hojas de <i>N. tabacum</i>	52

I.2.2 Análisis de la integridad y pureza de los anticuerpos purificados desde hojas y semillas de <i>N. tabacum</i>	55
I.2.3 Estudio del grado de glicosilación del anticuerpo 14D9 producido en plantas con ambas señales de direccionamiento.....	57
I.2.4 Localización subcelular de los anticuerpos por inmunomicroscopía electrónica.....	60
I.3 Discusión.....	62
I.4 Conclusiones.....	67
CAPITULO II: “EXPRESIÓN DE FUSIONES GFP-GUS A SEÑALES PUTATIVAS DE DIRECCIONAMIENTO VACUOLAR DERIVADAS DE UNA GLOBULINA DE RESERVA”.....	68-95
II.1 Introducción.....	68
II.2 Resultados y Discusión.....	71
II.2.1 Selección de las secuencias aminoacídica de la globulina 11S de amaranto que podrían determinar su direccionamiento a vacuolas y diseño de las construcciones.....	71
II.2.2 Transformación de una suspensión celular de <i>Arabidopsis</i> con los plásmidos conteniendo los genes reporteros fusionados a las señales putativas de direccionamiento vacuolar.....	72
II.2.3 Agroinfiltración de hojas de <i>Nicotiana tabacum</i> (expresión transitoria) con agrobacterium llevando los plásmidos conteniendo los genes reporteros fusionados a las señales putativas de direccionamiento vacuolar.....	74
II.2.4 Obtención de plantas transgénicas de <i>N. tabacum</i> con las fusiones GFP-GUS-señal vacuolar (expresión estable).....	76
II.2.4.1-Transformación de discos de hojas de <i>Nicotiana tabacum</i> con agrobacterias y regeneración de plantas transgénicas.....	76
II.2.4.2 Análisis molecular de las plantas transgénicas Nt-GFP-GUS-AmhCt y Nt-GFP-GUS-AmhH1N obtenidas para confirmar la presencia del transgen.....	77
II.2.5 Estudio del patrón espacial de expresión del gen reportero de la β -glucuronidasa de las plantas transgénicas Nt-GFP-GUS-AmhCt y Nt-GFP-GUS-AmhH1N.....	78

II.2.6 Estudio del patrón espacial de expresión del gen reportero GFP de las plantas transgénicas Nt-GFP-GUS-AmhCt y Nt-GFP-GUS-AmhH1N.....	81
II.2.6.1.1 Localización subcelular de GFP en hojas de plantas transgénicas Nt-GFP-GUS-AmhCt y Nt-GFP-GUS-AmhH1N por microscopia confocal de fluorescencia.....	82
II.2.6.1.2 Localización subcelular de GFP en raíces de plantas transgénicas Nt-GFP-GUS-AmhCt y Nt-GFP-GUS-AmhH1N por microscopia confocal de fluorescencia.....	85
II.2.6.1.3 Localización subcelular de GFP en semillas de plantas transgénicas Nt-GFP-GUS-AmhCt y Nt-GFP-GUS-AmhH1N por microscopia confocal de fluorescencia.....	88
II.3 Discusión.....	91
II.4 Conclusiones.....	95
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	96
PERSPECTIVAS.....	99
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	100-127

ABREVIATURAS

✦	ER	Retículo Endoplásmico.
✦	GA	Aparato de Golgi.
✦	VS	Vesícula Secretoria.
✦	Vs	Vacuolas.
✦	MP	Membrana Plasmática.
✦	TGN	Red del <i>trans</i>-Golgi.
✦	SP	Péptido Señal.
✦	SRP	Partícula de Reconocimiento de Señal.
✦	COPs	Complejo Proteico de Cubierta.
✦	ERES	Sitios de Exportación del ER.
✦	PSV	Vacuola de Almacenamiento de Proteínas.
✦	LV	Vacuola Lítica.
✦	PB	Cuerpos Proteicos.
✦	DV	Vesículas Densas.
✦	CCV	Vesícula Cubierta de Clatrina.
✦	GFP	Proteína Verde Fluorescente.
✦	RFP	Proteína Roja Fluorescente.
✦	YFP	Proteína Amarilla Fluorescente.
✦	mCherry	Proteína Fluorescente roja Cherry.
✦	GUS	β-Glucuronidasa.
✦	VSS	Señales de Direccionamiento Vacuolar.
✦	ssVSS	Secuencia-especifica como VSS.
✦	psVSS	Determinante Interno de Superficie como VSS.
✦	ctVSS	Señal de Direccionamiento Vacuolar Carboxi-terminal.
✦	AmhCt	ctVSS de globulina 11S de amaranto.
✦	AmhH1N	psVSS de globulina 11S de amaranto
✦	VSR	Receptores de Direccionamiento Vacuolar.
✦	RN	Rojo Neutro.
✦	X-Glu	ácido 5-Bromo-4-cloro-3-indol-β-D-glucurónico.



INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCION GENERAL

1. Las plantas como biorreactores para la producción de proteínas de interés

1.1 Visión general de *Molecular Farming*

El desarrollo de la tecnología de DNA recombinante en 1970 derivó en el surgimiento de los Organismos Genéticamente Modificados (OGMs), siendo las bacterias las primeras células utilizadas como fábricas para producir proteínas heterólogas (por ejemplo: con la producción de insulina en *E. coli*; Johnson, 1983). La tecnología del DNA recombinante fue luego mejorada y adaptada a levaduras (Curry *et al.*, 1988), a células animales (Simons *et al.*, 1987; Gordon *et al.*, 1987) y a células vegetales (Barta *et al.*, 1986), permitiendo la producción de un amplio rango de proteínas recombinantes. Sistemas basados en cultivos celulares han sido desarrollados para la producción a escala industrial respondiendo al incremento en la demanda de proteínas industriales, diagnósticas y biofarmacéuticas. Sin embargo, actualmente existe un gran número de proteínas recombinantes cuya demanda anual es superior a la tonelada de proteína por año, por lo que se debe recurrir a sistemas de alta capacidad de producción, como es el caso de los anticuerpos monoclonales (mAb). También, se debe considerar que las patentes de las primeras proteínas recombinantes terapéuticas han caducado y además han aparecido variantes mejoradas de los mismos, lo que estimula el desarrollo de métodos alternativos que sean más competitivos para su producción (Rader, 2008; Walsh, 2004). La industria farmacéutica necesita entonces de sistemas de alta capacidad, eficientes y rentables económicamente para la producción de proteínas terapéuticas. Actualmente, los sistemas de expresión no heterólogos no satisfacen todos los requerimientos que tienen las proteínas biofarmacéuticas, a pesar de los numerosos esfuerzos por mejorarlos (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009); por ejemplo, las proteínas complejas producidas en procariotas, no son siempre plegadas o procesadas apropiadamente para proveer el grado deseado de actividad biológica. Por consiguiente, los sistemas de expresión microbiológicos son utilizados generalmente para la expresión

de proteínas relativamente simples, que no requieren de plegado o de procesos postraduccionales exhaustivos, para ser activos biológicamente como en el caso de la insulina, el interferón o la hormona de crecimiento humano (Ferrer-Miralles, *et al.*, 2009). Por otro lado, los sistemas eucarióticos basados en cultivos de levaduras o células de mamíferos tienen numerosas desventajas, como el alto costo operativo, dificultades en el escalado a grandes volúmenes y la potencial contaminación por virus, priones, toxinas o patógenos humanos. Las plantas transgénicas en este caso, ofrecen muchas ventajas como por ejemplo: su manipulación génica es relativamente simple; realizan modificaciones postraduccionales típicas de eucariotas superiores; no son huéspedes de patógenos humanos por lo que es un sistemas más seguro; los costos de producción y la inversión requerida para establecer plantas de alta capacidad son mucho menores comparado con otros sistemas (Gomord *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2003; Schillberg *et al.*, 2003; Twyman *et al.*, 2003; Stoger *et al.*, 2005). La gran desventaja es que todavía los niveles de expresión son muy bajos para que la producción resulte rentable (Stoger *et al.*, 2005; Ma *et al.* 2005; Petruccioli *et al.*, 2006). No obstante, y a pesar de los bajos niveles de expresión de proteínas recombinantes, la facilidad con la que se puede incrementar la escala de producción, obteniéndose hasta 10 kg por hectárea considerando cultivos como: tabaco, maíz, soja o alfalfa (Austin *et al.*, 1994; Khoudi *et al.*, 1999), hacen que la producción de proteínas recombinantes en plantas sea muy prometedora.

TABLA 1: Proteínas recombinantes de interés comercial producidas en plantas.

Producto	Compañía	Planta	Nombre comercial	Nº Catalog./URL
Avidina	Prodigene	Maíz	Avidin	#A8703, Sigma-Aldrich
β -Glucuronidasa	Prodigene	Maíz	GUS	#G2035, Sigma-Aldrich
Tripsina	Prodigene	Maíz	TrypZean™	#T3568, Sigma-Aldrich
Lactoferrina Humana Recombinante	Meristem Therapeutics/ Ventria Bioscience	Maíz/Arroz	Lacromin™	#L4040, Sigma-Aldrich
Lisozima Humana Recombinante	Ventria Bioscience	Arroz	Lysobac™	#L1667, Sigma-Aldrich
Aprotonina	Prodigene	Maíz/ Tabaco transgénico	AproliZean	#A6103, Sigma-Aldrich
Lipasa Recombinante	Meristem Therapeutics	Maíz	Merispace®	http://www.meristem-therapeutics.com/
Factor Intrínseco Humano Recombinante	Cobento Biotech AS	<i>Arabidopsis</i>	Coban	http://www.cobento.dk/?id=76

Adaptado de *Sharma y col.*, 2009.

Así, un gran número de proteínas de interés para terapia, prevención (profilaxis), diagnóstico o con aplicaciones industriales se producen en distintos tipos de vegetales,

generalmente en hojas (Ma *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2004; Schillberg *and* Twyman, 2004) o en tejidos de almacenamiento de cereales y en raíces (Menkhaus *et al.*, 2004; Stoger *et al.*, 2005), algunas de las cuales se comercializan recientemente (Tabla 1) y, otras tantas se encuentran en etapas avanzadas de pruebas o preclínicas (Tabla 2). Aunque en otros sistemas de producción la especie utilizada en la expresión fue rápidamente adoptada y las buenas prácticas de manufactura establecidas (por ejemplo *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, cultivos de células de ovario de hamster, células CHO) (Ferrer-Miralles *et al.* 2009), en plantas todavía hay varias especies como por ejemplo *Carthamus tinctorius L*, *Oryza sativa*, *Triticum durum*, *Zea mays L.*, *Nicotiana tabacum*, *Medicago sativa*, *Lemna minor* (Ma *et al.*, 2005) que se encuentran en estudio.

Tabla 2: Proteínas recombinantes de interés comercial producidas en distintos sistemas vegetales y que se encuentran en etapas avanzadas de pruebas o etapas preclínicas.

Producto	Planta Sistema	Indicaciones	Compañía/Referencia
CTB-enterotoxina rotavirus (NSP4)	Papa/Callo y tubérculo	Vacuna Cólera y Gastroenteritis por rotavirus	Arakawa y col., 2001.
CTB	Tabaco/Hojas	Vacuna Cólera	Jani y col., 2004
CTB-InsB3	Tabaco/Hojas	Vacuna Cólera	Li y col., 2006.
CTB	Tabaco/Hojas	Vacuna Cólera	Mishra y col., 2006.
CTB-SpaA (antígeno de superficie)	Tabaco/pelos de raíz	Vacuna Cólera y Erisipelas (inflamación aguda piel)	Ko y col., 2006.
CTB	Arroz/semilla	Vacuna Cólera	Nochi y col., 2007.
sCTB-KDEL	Lechuga/Hojas	Vacuna Cólera	Kim y col., 2006.
Subunidad B toxina termolábil (LTB)	Tabaco/Hojas	Vacuna Diarrea por toxina B <i>E. coli</i>	Haq y col., 1995.
LTB-Toxina termoestable <i>E. coli</i>	Tabaco/cloroplastos	Vacuna <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	Rosales-Mendoza y col 2009
LTB-Toxina termolábil <i>E. coli</i>	Soja/semillas	Vacuna <i>E. coli</i> LTB	Moravec y col., 2006
LTB-Toxina termolábil <i>E. coli</i>	Zanahoria/raíz y Hojas	Vacuna <i>E. coli</i> LTB	Rosales-Mendoza y col 2008
PBsVP6	Alfalfa/Hojas	Antígeno Gastroenteritis rotavirus	Dong y col., 2005.
Glucoproteína RGP	Tomate/Fruto	Vacuna antirrábica	McGarvey y col., 1995.
Glucoproteína RGP	Tabaco/Hojas	Vacuna antirrábica	Ashraf y col., 2005.
Nucleoproteína RNP	Tomate/Fruto	Vacuna antirrábica	Arango y col., 2008.
Glicoproteína NDV	Arroz/semilla y hojas	Vacuna enfermedad de Newcastle (ND)	Yang y col., 2007.
Hemaglutinina MV-H	Tabaco/Hojas	Vacuna antisarampionosa	Huang y col., 2001
Hemaglutinina MV-H	Tabaco/Hojas	Vacuna antisarampionosa	Webster y col., 2002
Hemaglutinina MV-H	Zanahoria/raíz y Hojas	Vacuna antisarampionosa	Marquet-Blouin y col., 2003

Adaptado de Siddharth Tiwari 2009.

Tabla 2 continuación: Proteínas recombinantes de interés comercial producidas en distintos sistemas vegetales y que se encuentran en etapas avanzadas de pruebas o etapas preclínicas

Producto	Planta Sistema	Indicaciones	Compañía/Referencia
Glicoproteína S	Arabidopsis/Hoja	Vacuna Gastroenteritis transmisible (TGE)	Gómez y col., 1998
Glicoproteína S	Papa/Tubérculo	TGE	Gómez y col., 2000
Glicoproteína S	Tabaco/Hojas	TGE	Tuboly y col., 2000
Proteína estructural VP60	Papa/Hoja y tubérculo	Vacuna Síndrome hemorrágico de conejo (RHDV)	Castañon y col., 1999
Proteína estructural VP60	Papa/Hoja y tubérculo	Vacuna RHDV	Castañon y col., 2002
Proteína estructural VP60	Papa/Tubérculo	Vacuna RHDV	Martin-Alonso y col., 2003
Antígeno A (Proteína de superficie)	Tabaco/Hojas	Anti- <i>Streptococcus mutans</i>	Curtiss and Cardineau, 1990
Glicoproteína de VSVG	Tabaco/Hojas	Vacuna Virus de Estomatitis Vesicular (VSVG)	Galbrain y col., 1992
Glicoproteína B	Tabaco/Semilla	Vacuna Citomegalovirus Humano (HCMV)	Tackaberry y col., 1999
Proteína de cápside VP2	Arabidopsis/Hoja	Vacuna Parvovirus canino	Gil y col., 2001
Sero Albumina Bovina (HSA)	Tabaco	Uso no clínico	Chlorogen Inc.
Interferon α 2b	Lemma	Hepatitis B, C y Cáncer hepático	Biolex Inc.
Leucotoxina (Lkt)	Trébol blanco/Hojas	Vacuna <i>Mannheimia haemolytica</i> (diarrea viral bovina)	Lee y col., 2001
Antígeno Tetánico	Tabaco/cloroplastos	Vacuna anti- <i>Clostridium tetanis</i>	Tregoning y col., 2001
Anticuerpo α -Caries (CaroX ₁₀)	Tabaco	Prevención de caries	Planet Biotechnology Inc.
Colágeno	Alfalfa	Uso no clínico	Medicago Inc.
Colágeno	Tabaco	Uso no clínico	Meristem Therapeutics Inc.
Proteína de cubierta B5 <i>Vaccinia</i>	Tabaco/Hojas	Vacuna contra Viruela (virus <i>Vaccinia</i>)	Golovkin y col., 2007,
Proteína de anclaje HIV-1	Tomate/Fruto	Tratamiento/Vacuna HIV/SIDA	Ramirez y col., 2007.
β -amiloido humano	Papa/tubérculo	Tratamiento/Vacuna Alzheimer's	Kim y col., 2003.
β -amiloido humano	Tomate/Fruto	Tratamiento/Vacuna Alzheimer's	Youma y col., 2008.
H5/HA1 variante HDEL	Tabaco/Hojas	Antígeno Gripe Aviar Influenza tipo H5/HA1	Spitsin y col., 2009.
Proteína de fusión F1-V	Tomate/Fruto	Vacuna Peste Bubónica/Neumoniasis (<i>Yersinia pestis</i>)	Alvarez y col., 2006
Proteína de fusión F1-V	Tabaco/cloroplastos	Vacuna Peste Bubónica/Neumoniasis (<i>Yersinia pestis</i>)	Arlen y col., 2008.
Proteína de cápside HPV11	Células de tabaco NT1	Vacuna Virus Papiloma Humano (HPV), Cáncer Cervical	Warzecha y col., 2003.
scFV-HER2	Tabaco/Hojas	Cancer de pulmón (Receptor-2 factor de crecimiento)	Galeffi y col., 2005.
Epitope HPV16	Tabaco/Hojas	Vacuna Cáncer Cervical Virus Papiloma Humano (HPV)	Hoffmeisterova y col., 2008
Proteína estructural VP1	Tabaco/Hojas	Vacuna Virus Fiebre Aftosa	Wigdorovitz y col., 1999a
Proteína estructural VP1	Alfalfa/Hojas	Vacuna Virus Fiebre Aftosa	Wigdorovitz y col., 1999b
Proteína estructural VP1	Quinoa/Tabaco	Vacuna Virus Fiebre Aftosa	Yang y col., 2007.
Antígeno de superficie HBsAg	Tabaco/Hojas	Vacuna Hepatitis B	Mason y col., 1992.
Antígeno de superficie HBsAgS/M	Tabaco/Hojas	Vacuna Hepatitis B	Huang y col., 2005.
Antígeno de superficie HBsAg	Tomate/Fruto	Vacuna Hepatitis B	Srinivas y col., 2008.
Proteína de anclaje HIV-1	Espinaca/Hojas	Vacuna HIV-1	Karasev y col., 2005
Proteína transmembrana gp41	Arveja/hojas	Tratamiento HIV y lesiones neurológicas	Durrani y col., 1998.
Subunidad B toxina colérica (CTB)	Tabaco/Hojas	Vacuna Cólera	Hein y col., 1996
CTB	Papa/Hoja y tubérculo	Vacuna Cólera	Arakawa y col., 1997
CTB-INS (insulina)	Papa/Hoja y tubérculo	Tratamiento Cólera y Diabetes	Arakawa y col., 1998

Adaptado de Siddharth Tiwari 2009.

También se ha recurrido a la integración de genes codificantes para proteínas recombinantes de interés en el genoma cloroplastos, aprovechando su gran número dentro de la célula vegetal y que puede controlarse el sitio de integración en el genoma reduciendo de esta manera los efectos de posición (Grevich *and* Daniell 2005). Esta estrategia permite obtener altos niveles de acumulación (Grevich *and* Daniell 2005); sin embargo, este tipo de táctica se encuentra limitada a proteínas que no requieran glicosilación, formación de uniones disulfuro, procesamientos proteolíticos, oligomerización, isoprenilación y otro tipo de modificaciones postraduccionales muchas veces requeridas para generar un producto activo, por lo que deben ser dirigidas a la vía secretoria (Faye *et al.* 2005). Entre estas proteínas se pueden mencionar: inmunoglobulinas, citoquinas, hormonas (ej. prolactina, eritropoyetina, factor estimulador de colonias de monocitos-granulocitos), factores de crecimiento (epidérmico o derivado de plaquetas) factores de coagulación, componentes del complemento, polipéptidos fibrinolíticos, albúminas, enzimas empleadas en diagnóstico, terapia y también en procesamiento industrial como: proteasas, celulasas, peroxidasas, lacasas, pectoliasas, lipasas (Boehm, 2007, Reichert *and* Healy 2001, Stoger *et al.* 2005).

1.2 Las plantas como sistemas de expresión para la síntesis de anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales son el grupo de proteínas recombinantes más importantes por sus aplicaciones en terapia, diagnóstico e investigación. La estructura general de un anticuerpo completo (inmunoglobulina tipo G) consiste en dos cadenas

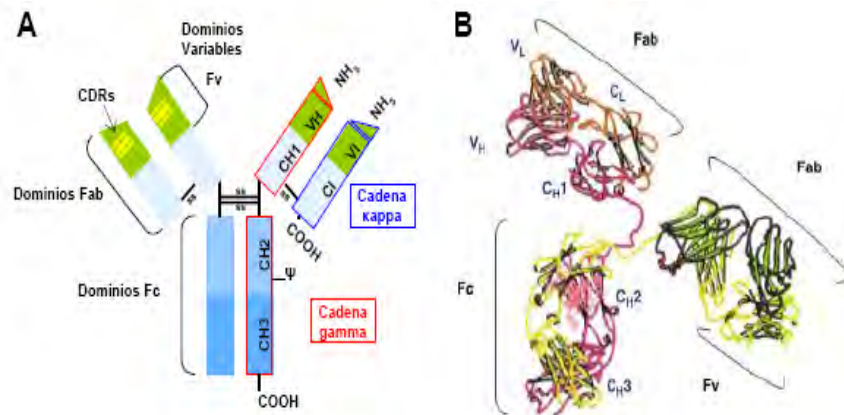


Figura 1: Representación esquemática de un anticuerpo completo (A) o, su arquitectura molecular (RCSB *Protein Data Bank*) en (B). Los dominios individuales unidos de la inmunoglobulina son indicados como CH, CL, VH y VL, así como los sitios de unión a antígenos heterodiméricos VL/VH (Fv). La imagen (B) es adaptada de *Filpula et al., 2007*.

polipeptídicas pesadas (isotipos γ , ϵ , δ , α o μ) y dos cadenas livianas (isotipos κ o λ), organizadas a través de interacciones covalentes (puentes disulfuro) en una unidad funcional bivalente (salvo en el caso de inmunoglobulinas M en que se asocian cinco de estas unidades y que por lo tanto son decavalentes). Las uniones disulfuro son un importante componente en la estabilidad y estructura de las inmunoglobulinas. Los puentes intracatenarios estabilizan el plegado de los diferentes dominios mientras que los intercatenarios estabilizan la interacción tanto de las cadenas pesadas entre si como la asociación entre las cadenas pesadas y livianas (Burton, 2001) (Figura 1). Otro rasgo característico de los anticuerpos, es que presentan un sitio de glicosilación en el subdominio constante CH2 de la cadena pesada (Figura 1A, ψ); los diferentes grados de glicosilación en este sitio, afectan la vida media en sangre del anticuerpo y, la habilidad del anticuerpo de desencadenar reacciones de citotoxicidad, ya sea dependiente de complemento (DCAC, *Complement-dependent antibody cytotoxicity*) o bien, dependiente de células (ADCC, *antibody dependent cellular toxicity*) (Figura 2) (Jefferis, 2005). Por eso, si en terapia se va a utilizar una inmunoglobulina completa, la misma debe tener un grado de glicosilación adecuado para inducir estas respuestas y que le permita además tener una vida media en sangre suficientemente larga para ejercer el efecto. Para otras aplicaciones, no se requiere de esta actividad de desencadenar respuestas citotóxicas, por ejemplo el evitar la adhesión de células, bloquear receptores o competir con un ligando, en estos casos pueden emplearse fragmentos de inmunoglobulina. Otra aplicación en la que se pueden emplear fragmentos de inmunoglobulina, es cuando la actividad citóxica de las moléculas o células reclutadas por el anticuerpo es sustituida realizando fusiones del fragmento de anticuerpo a toxinas, citoquinas o radioisótopos que son las que llevan a cabo las funciones efectoras (Figura 2).

Los requerimientos de procesado y ensamblado de más de una cadena, formación de uniones disulfuro y glicosilación, determinan que las inmunoglobulinas sólo puedan ser expresadas en células de eucariotas superiores, siendo las plantas transgénicas el sistema de producción más prometedor. La expresión exitosa de una inmunoglobulina recombinante completa en hojas de tabaco, fue informado en los inicios de la biotecnología vegetal moderna por los investigadores del *The Scripps Research Institute*, La Jolla, California, Hiatt y colaboradores (1989), sin embargo todavía no hay ninguna inmunoglobulina comercial producida en este sistema. La

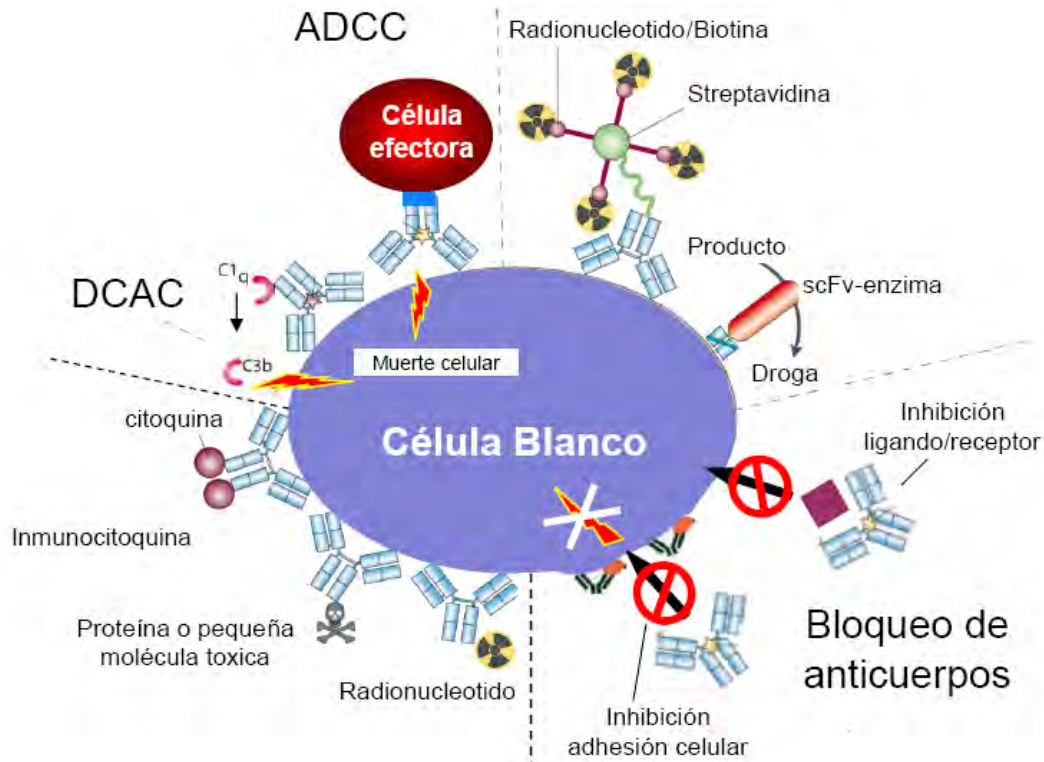


Figura 2: Esquema de las posibles estrategias que se pueden emplear para matar una célula tumoral empleando anticuerpos recombinantes. Adaptado de Carter *et al.*, 2001.

calidad de estas inmunoglobulinas en términos de plegado, modificaciones postraduccionales (por ejemplo N-glicosilación) y actividad biológica es crucial para su industrialización, en este sentido, es de suma importancia conocer la ruta de transporte y destino final de la proteína heteróloga expresada en planta, ya que determinará el grado de maduración y modificaciones postraduccionales. En la actualidad, el conocimiento de las rutas de transporte y las modificaciones postraduccionales en células vegetales, o en los distintos órganos de la planta, es escaso, necesitando de investigaciones adicionales. Justamente, la mayoría de las publicaciones indican los niveles de acumulación alcanzados sin mencionar dónde la proteína fue depositada o la naturaleza de los glicanos adicionados, a pesar que esto podría tener un impacto crítico en la estabilidad y actividad biológica de la glicoproteína (Hood, 2004; Petruccioli *et al.*, 2006). Para poder comparar las plantas con los distintos sistemas de producción como levaduras y células de mamíferos, en términos de actividad proteica e inmunogenicidad, la estructura de los N-glicanos de los plantículos debe ser estudiada. Además, es necesario combinar estos estudios con los que indican el sitio de localización de la proteína dentro de la célula vegetal en los distintos órganos y especies empleadas para su producción, y así poder determinar la mejor combinación de patrones de N-

glicosilación, estabilidad proteica y acumulación, actividad biológica y otras características requeridas para la industrialización y propósitos terapéuticos.

Antes de profundizar en las reacciones de glicosilación en plantas y su comparación con la de otros sistemas de expresión de anticuerpos, como la barrera tecnológica principal para la utilización de plantas como biorreactores sigue siendo los reducidos niveles de acumulación, a continuación se van a presentar algunas de las estrategias que han propuesto distintos investigadores para tratar de superar esta limitación. Muchas de estas estrategias implican la utilización de señales de direccionamiento a distintos compartimientos por lo que van a repercutir en las modificaciones postraduccionales particularmente en la glicosilación.

1.3. Estrategias generales que pueden emplearse para incrementar los niveles de acumulación de proteínas recombinantes en plantas

Diferentes estrategias han sido ensayadas con el fin de lograr mayores niveles de acumulación de la proteína de interés, entre ellas se puede mencionar la optimización de la construcción para incrementar los niveles de transcripción y de traducción, para mejorar la eficiencia en las modificaciones co y postraduccionales, incremento de la estabilidad, el direccionamiento de la proteína a organelas con alta capacidad de acumulación y también, la expresión en diferentes órganos o, inclusive las estrategias para mejorar los procesos de purificación *downtreams* de la proteína recombinante. A continuación se citan algunas estrategias comunes y generales aplicadas en la expresión de distintas proteínas heterólogas.

1.3.1 El incremento en la eficiencia de los procesos de transcripción y/o traducción como estrategia para incrementar los niveles de acumulación de la proteína de interés.

La eficiencia de transcripción depende de la secuencia promotora, incluyendo *enhancers*, de la secuencia de terminación de la transcripción y otros elementos regulatorios que determinan el estado de la cromatina. En general, se utilizan diferentes promotores, los cuales se clasifican por el tipo de actividad; a manera de ejemplo podemos citar entonces: **promotores constitutivos fuertes**, que inducen la expresión de

genes en una forma menos dependiente de factores espaciales, del entorno o de desarrollo y se utilizan generalmente para la producción de proteínas recombinante en todos los tejidos de la planta. Uno de los más extensamente utilizados, y con el que se ha alcanzado altos niveles de expresión y acumulación, es el promotor 35S del virus de mosaico del Coliflor (35S CaMV, *Cauliflower Mosaic Virus*). La producción de varias proteínas antigénicas como el antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg), la glicoproteína G del virus de la rabia o, productos de importancia industrial como streptavidina, avidina y adiponectina, son algunos ejemplos en los que se utilizado este promotor. Asimismo, podemos mencionar el promotor de la ubiquitina, ampliamente utilizado para expresar eficientemente en monocotiledóneas (maíz, trigo, arroz, entre otros), siendo sus niveles de expresión en hojas y semillas comparables con el 35S CaMV, incluso cuando la proteína recombinante no es detectada al utilizarse el promotor 35S CaMV en semilla. Recientemente, Hernandez-Garcia *et al.* (2009) han reportado la caracterización de un promotor constitutivo fuerte de poli-ubiquitina de soja. Para la producción de biomoléculas pueden incluirse otros promotores constitutivos como, el promotor génico de la manopina sintetasa, el promotor MAC, que es un híbrido entre el promotor de la manopina y la región *enhancer* del 35S y, el promotor de actina de arroz entre otros. Por otro lado, encontramos **promotores inducibles**, donde la actividad del mismo puede ser modulada a veces, por componentes químicos endógenos o exógenos y otras, regulada por factores del medio o del desarrollo como la sequía, estrés salino, luz, temperatura, etc. En general son utilizados cuando la expresión del transgen interfiere con el desarrollo o crecimiento normal de la planta y especialmente en los casos en que la producción de la biomolécula es letal para la planta. Entre varios ejemplos, podemos citar el promotor inducible de alfa-amilasa de arroz (α Amy3), utilizado para la expresión de α 1-antitripsina (Terashima *et al.*, 1999), del interferón gamma humano (Chen *et al.*, 2004) o, para la hormona de crecimiento humano (Kim *et al.*, 2008). Además encontramos el promotor inducible por estrés mecánico como el hidroxio-3-metilglutaril-CoA reductasa (Cramer *et al.*, 1996) o, el sistema de la RNA polimerasa del bacteriófago T7, con sobreexpresión inducible o tejido específica (Nguyen *et al.*, 2004). Otro tipo de promotores utilizados son los **promotores tejido específicos**, que controlan la expresión de manera específica en un tejido o del estado de desarrollo. Estos son muy utilizados para concentrar la proteína recombinante en ciertos órganos, como semillas o frutos, disminuyendo los posibles efectos negativos en el crecimiento y desarrollo del resto de la planta y facilitando

además, en algunos casos, la eficiencia de cosecha. Varios de estos promotores han sido estrictamente caracterizados, especialmente para la expresión de proteínas en semillas (Lau *and* Sun, 2009), entre ellos el promotor de la subunidad α' de la β -conglucina de soja (Petruccelli *et al.* 2006), de la globulina 7S (Fogher, 2000), de la arcelina (De Jaeger *et al.* 2002) o de la globulina-1 (Belanger *and* Kriz, 1991) de maíz o, el de glutelina de arroz (Wu *et al.*, 1998). Entre otros podemos citar también, los **promotores artificiales** que han sido desarrollados en el pasado por ingeniería combinatorial de elementos *cis* que incluyen *enhancer*, activadores y/o represores. Por último, podemos nombrar la utilización de **factores de *cis*- o *trans*-activación** (*cis*- o *trans*-acting factors), estos factores se unen directamente al promotor para dirigir la expresión o, interactúan con otros factores reclutándolos para unirse al promotor (Beachy *et al.* 2007). Esta estrategia ha sido utilizada exitosamente para aumentar en especial la expresión de genes reporteros (Yang *et al.*, 2001) así como también, un sistema de *trans*-activación mediada por virus que fue utilizado mediante inoculación transciende en líneas transgénicas, mejorando la expresión del anticuerpo 9F12 antitetánico (Hull *et al.*, 2005).

Otro punto muy importante, para mejorar la eficiencia y la fidelidad de la traducción de los sistemas de expresión en plantas, es modificar los codones del gen de interés para adecuarlo al uso de codones de la especie vegetal empleada, también incluir la secuencia de Kozak, evitar que la secuencia del mRNA que se genere tenga intrones crípticos, secuencias ricas AT (que provocan el “resbalado” de los ribosomas) o que tengan tendencia a adquirir estructura secundaria. Por ejemplo, al compararse la expresión en tabaco del gen insecticida *cryIA* salvaje, con uno en que se optimizó el uso de codones (modificando el 21% de los nucleótidos) se logró un incremento aproximadamente 100 veces en la acumulación de la proteína insecticida (Batard *et al.*, 2000; Hamada *et al.*, 2005). Asimismo, la posición y el contexto favorable del codón de iniciación tiene un rol muy importante en el inicio de la transcripción (Kozak, 1995), secuencias como: ACC o ACA precedente al ATG han sido utilizadas para optimizar la expresión del transgen en plantas (Sharma *et al.*, 2008a; Stomp *et al.*, 2004).

En la mayoría de los eucariotas, para el inicio de la transcripción son muy importantes las regiones 5' sin traducir (5'UTR, 5' *untranslated region*), por ejemplo la utilización del 5'UTR del gen de la poliubiquitina de arroz, utilizada junto con su

promotor, produce un incremento en los niveles del mRNA de la β -glucuronidasa (GUS) (tanto por incremento en la síntesis como en estabilidad del mRNA) produciendo también una traducción más eficiente (Lu *et al.*, 2008; Samadder *et al.*, 2008), demostrando su importancia en la eficiencia del proceso. Por otro lado, y no menos importante, es la región 3' sin traducir (3'UTR, 3' *untranslated regions*) ya que contienen la información necesaria para la poliadenilación, que también determina la estabilidad del mRNA, pues el mismo debe pasar los mecanismos de control de calidad (Chan *and* Yu, 1998). Así, 3'UTR heterólogos han sido utilizados para estabilizar transcritos recombinantes (Huang *et al.*, 2005a; Ko *et al.*, 2003; Staub *et al.*, 2000).

Uno de los factores a tener en cuenta en la expresión del gen de interés, son los efectos de posición, el número de copias de transgen integradas y el posible silenciamiento (Bhat *and* Srinivasan, 2002; Butaye *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2008). Por ello, muchas estrategias han desarrollado vectores o *cassettes* de expresión pensados para lograr niveles de expresión uniformes independientemente del sitio de integración. Entre tantas, podemos citar las MAR's (*Matriz attachment regions*), que también engloban las secuencias regulatorias, por ejemplo estos elementos ricos en bases nucleotídicas AT que reducen los efectos de posición por la formación de *loops*, haciendo que el transgen quede en una zona en que la cromatina es activa, incluso en las generaciones subsiguientes (Vain *et al.*, 1999). El uso de MARs en plantas no siempre ha mejorado los niveles de acumulación de la proteína de interés, sin embargo actualmente se están empleando estrategias computacionales y ómicas para identificar secuencias que puedan producir este efecto de evitar la formación de heterocromatina alrededor del transgen (Levin *et al.* 2005, Oh *et al.* 2005, Shirai *and* Fukuda 2006, Tetko *et al.* 2006, Verma *et al.* 2005). Este tipo de estrategias han producido muy buenos resultados en células CHO (Wang *et al.* 2008).

1.3.2 El incremento en la eficiencia de los procesos co y post-traduccionales como estrategia para generar una proteína modificada adecuadamente y para incrementar la cantidad de producto con actividad biológica.

Durante la síntesis de la proteína así como también una vez completada la traducción, se llevan a cabo varias modificaciones cuya eficiencia puede variar ya que depende de la presencia de proteínas auxiliares y de la maquinaria que transporta a la

proteína a su destino final. El plegamiento de proteínas con varios dominios suele requerir de la asistencia de chaperonas, muchas de ellas específicas para ciertas familias (de Marco 2009, Houston *et al.* 2005, Huo *et al.* 2007, Krishna and Gloor 2001). El clivaje proteolítico del péptido señal y también el paso de la proproteína a proteína por acción de endopeptidasas, también es importante para el plegamiento correcto. Además, se producen modificaciones por introducción de nuevos grupos funcionales por la acción de enzimas como por ejemplo, glicosilación, fosforilación, metilación, ADP-ribosilación, oxidación, acilación, isoprenilación, y también modificaciones no enzimáticas como deaminaciones, racemizaciones, etc. (Gomord *and* Faye, 2009), cada una de ellas cumple un papel de menor o mayor importancia determinando la estructura y la actividad de la proteína de interés. Para lograr que estas modificaciones sean las adecuadas para el producto final, se han empleado diferentes sistemas heterólogos como bacterias, levaduras, células de insectos, de mamíferos o plantas. Por ejemplo, como fuera mencionado en secciones anteriores, se ha puesto mucho esfuerzo en generar sistemas de expresión que glicosilen adecuadamente ya que, los eucariotes inferiores sólo adicionan glicanos simples y las modificaciones más complejas son muy dependientes de la especie a que pertenece el organismo superior utilizado (Bardor *et al.*, 2002; Gomod *et al.*, 2005; Raju *et al.* 2000). Por este motivo, tanto en células vegetales como en líneas celulares de mamíferos se ha recurrido a la glicoingeniería introduciendo las enzimas faltantes en la célula hospedadora o bien silenciando enzimas que producen glicanos inmunogénicos. Detalles de las modificaciones post-traduccionales y sus efectos serán desarrollados en secciones posteriores. Entre las varias estrategias para evitar la adición de glicanos inmunogénicos se puede mencionar la retención en retículo endoplásmico (ER, *endoplasmic reticulum*), la inhibición de glicosiltransferasas del aparato de Golgi (GA, *Golgi apparatus*) específicas de plantas y, una estrategia interesante, últimamente desarrollada, como la “humanización” de plantas por expresión heteróloga de glicosiltransferasas de mamíferos (Bakker *et al.*, 2006; Zeleny *et al.*, 2006; Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007).

1.3.3 El direccionamiento de la proteína recombinante a distintos compartimientos como estrategia para incrementar los niveles de acumulación

El direccionamiento de proteínas recombinantes a distintos compartimientos subcelulares, en distintos tejidos y/u órganos, representa una alternativa para

incrementar el rendimiento de producción e, inclusive en algunos casos para facilitar los primeros pasos de purificación. De este modo, diferentes órganos de plantas (hojas, semillas y raíces) o compartimientos subcelulares (ER, cloroplastos, mitocondrias, vacuolas o cuerpos lipídicos) han sido eficientemente utilizados para la síntesis de muchas biomoléculas (Gomord *and* Faye, 2009). Generalmente, el transgen es introducido en el genoma nuclear y el mismo es diseñado de forma tal que contenga aquella información necesaria para su direccionamiento, en algunos casos las señales de direccionamiento son múltiples. Detalles de las distintas señales y vías de direccionamiento serán tratadas en secciones posteriores.

Igualmente, podemos mencionar que muchas proteínas producidas en plantas, han sido secretadas al espacio intracelular o el apoplasto de diferentes órganos como hojas, semillas y raíces para aumentar su producción (Goldstein *and* Thomas, 2004; Hellwig *et al.*, 2004). El empleo de este tipo de señales puede hacerse tanto empleando células vegetales en suspensión o recurriendo a rizosecreción de cultivos hidropónicos, lo que facilita la recuperación de la proteína del medio, simplificando el proceso de purificación (Sharp *and* Doran, 2001). No obstante, un gran número de proteínas producidas con este sistema presenta como inconveniente su baja estabilidad, lo que conlleva a la degradación y pérdida del producto. El problema de la degradación en estos sistemas puede revertirse parcialmente empleando agentes estabilizantes de proteínas (gelatina y PVP: polivinilpirrolidona) y co-secreción de inhibidores de proteasas (Sharp *and* Doran, 2001, Komarnytsky *et al.*, 2006; Sabharwal *et al.*, 2007, Martinez *et al.* 2005).

En contraste, como fuera mencionado anteriormente, una de las estrategias más eficiente para aumentar la estabilidad y el rendimiento ha sido la expresión en cloroplastos, observándose en algunos casos niveles de acumulación de la proteína recombinante de hasta un 46% de proteínas totales de hojas (De Costa *et al.*, 2001). Sin embargo, la producción en esta organela presenta la desventaja de la capacidad limitada de procesamiento de las proteínas, en especial su incapacidad de producir glicosilaciones.

Otro método que ha sido utilizado con éxito para estabilizar la proteína de interés, es la retención en ER con uso de secuencias como HDEL/KDEL fusionadas su

extremo C-terminal (Wandelt *et al.*, 1992). Esta estrategia originalmente descrita para la vicilina (proteína de reserva de arveja) mostró que el uso de esta señal producía incrementos entre 20-100 veces en los niveles de acumulación en hojas (Wandelt *et al.*, 1992). Debido al gran éxito logrado para esta proteína, la estrategia fue extendida a un gran número de proteínas recombinantes obteniéndose resultados muy variables, desde no observar efectos a incrementos de 10 veces en el orden de magnitud (Conrad *and* Fiedler, 1998).

Entre los diferentes tejidos o compartimientos subcelulares blancos para el direccionamiento, que permiten aumentar la estabilidad y el rendimiento de las proteínas heterólogas, se encuentran los órganos de reservas en semilla. Esta estrategia ha sido adoptada por varias empresas comerciales con el uso de semillas de cereales (Tabla 1, Hood *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2004; Menkhaus *et al.*, 2004). La producción en semillas ofrece además la ventaja de que las proteínas pueden acumularse en un volumen pequeño y de manera estable por largos períodos a temperatura ambiente lo que abarata los procesos *downstream* (Kusnadi *et al.*, 1997; Menkhaus *et al.*, 2004; Stoger *et al.*, 2005). Asimismo, la fusión de la proteína de interés a oleosinas (polipéptido que forma parte de la membrana que rodea las gotas lipídicas acumuladas en semillas de oleaginosas), reduce los costos en las etapas de purificación, ya que la biomolécula queda en una primer etapa en la fase lipídica (la cual casi no contiene otras proteínas) y luego es separada de la oleosina por distintos métodos, pasando la proteína de interés a la fase soluble (Moloney, 2002). Esta estrategia para iniciar la purificación es muy efectiva, de bajo costo y mucho más competitiva que las cromatografías.

La presencia de órganos de reserva de proteínas en el interior de células fue inicialmente descrita en semilla ya que la capacidad de almacenar proteínas para ser utilizadas como fuente de nitrógeno durante el desarrollo de la plántula es una característica única de plantas, pues los animales no tienen reservas de nitrógeno. Así, vacuolas con las mismas características a las observadas en células de endosperma y cotiledones de semilla han sido descritas en otros tipos celulares. El primer trabajo en este sentido fue el de Paris *et al.* (1996) que mostró la coexistencia de vacuolas no acídicas (similares a vacuolas de almacenamiento de proteínas) y vacuolas acídicas (o vacuolas líticas, que serían equivalentes a los lisosomas de células animales) en células

de la punta de raíz de cebada (Paris *et al.*, 1996). Este hallazgo abrió nuevos interrogantes sobre cómo se forman estos compartimientos y cómo la célula logra específicamente direccionar a uno u otro compartimiento. Tal vez un compartimiento equivalente en células animales serían los gránulos de secreción observados, por ejemplo en células del sistema endocrino pero hasta el momento esto no ha podido ser probado y por otro lado, existen diferencias evolutivas importantes entre células vegetales y otros eucariotas, como lo demuestra el hecho de que la levadura no es un buen modelo para estudiar direccionamiento de proteínas vegetales a vacuolas (Gay *and* Raikhel, 1994) y que además, el transporte a vacuolas acídicas (lisosomas) en células animales es mediado por el receptor de manosa, sistema que no ha sido descrito en células vegetales (Alberts, 2008). La coexistencia de vacuolas de naturaleza acídica y no acídica ha sido también descritos en la aleurona de cebada (Swanson *et al.*, 1998), en células de mesófilo en empalizada y esponjoso de hojas de tabaco (Di Sansebastiano *et al.*, 1998, Park *et al.*, 2004), de poroto (Park *et al.*, 2004) y en meristemas de raíz de plántulas de cebada y arveja (Olbrich *et al.*, 2007); en cambio, en células de mesófilo de *arabidopsis* se observa un único tipo vacuolar (Park *et al.*, 2004). El direccionamiento de proteínas recombinantes a estas vacuolas de reserva, sería otra posibilidad para la acumulación de proteínas recombinantes de interés.

2. Descripción general de la vía secretoria en plantas.

2.1 Los componentes de la vía secretoria

En las células eucariotas, el sistema de membranas internas que delimitan distintos compartimientos dentro de la célula, excluyendo plástidos y mitocondrias, a menudo es denominado “sistema de endomembranas”. El mismo esta compuesto por organelas específicas, las cuales están principalmente especializadas en la producción y maduración de macromoléculas, su almacenamiento, degradación y reciclado. En términos generales las organelas que constituyen el sistema de endomembranas son: el Retículo Endoplásmico (ER, *endoplasmic reticulum*), el Aparato o Complejo de Golgi (GA, *Golgi apparatus*), Vesículas Secretorias (SV, *secretory vesicles*), distintas Vacuolas (Vs) y la Membrana Plasmática (Morré *and* Mollenhauer, 1974) (Figura 3). El ER comprende una red tridimensional de túbulos continuos y hojas que subyace a la membrana plasmática, distribuido en el citoplasma y en continuación a la envoltura

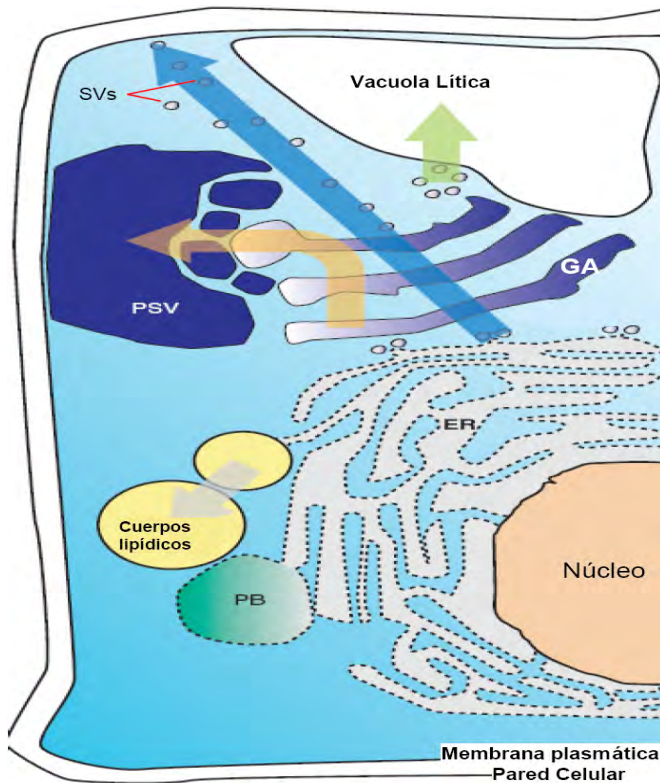


Figura 3: Sistema de endomembranas general en la célula vegetal. Aparato o Complejo de Golgi (GA, *Golgi apparatus*), Retículo endoplásmico (ER, *Endoplasmic Reticulum*), Cuerpos Proteicos (PB, *Protein body*), Vacuola de almacenamiento de proteínas (PSV, *Proteins storages vacuols*) y Vesículas secretorias (SV's, *Secretory vesicles*). Adaptado de Vitale y Pedrazini (2005)

nuclear. La literatura clásica distingue tres tipos o subcompartimientos de ER: el rugoso, el liso y la envoltura nuclear. Sin embargo, hoy en día se sugiere una clasificación basada en los distintos dominios metabólicos, morfológicos u otros criterios (Staehein *et al.*, 1997). En plantas, el GA presenta muchas funciones y rasgos que son similares a lo observado en mamíferos, aunque también existen algunas características únicas. La mayor diferencia es en cuanto a estructura, mientras que en células de mamíferos el GA tiene una posición perinuclear casi estacionaria, en plantas esta dividido en apilamientos individuales, siendo el más próximo al ER denominado *cis*-Golgi, seguido del *Golgi-medio* y el más alejado conocido como *trans*-Golgi; al final se encuentra un red compleja de cisternas la cual se la ha llamado Red del *trans*-Golgi (TGN, *trans golgi network*). Todas estas cisternas, en general, son consideradas funcionalmente independientes (Staehein *and* Moore, 1995), ya que cada una puede describirse como una estructura polarizada en términos de morfología cisternal y actividad enzimática, cambiando gradualmente desde el *cis*- al *trans*-Golgi (Fichette Laine *et al.*, 1999). Por otro lado, de manera más específica, en el sistema de endomembranas encontramos el Compartimiento Pre-Vacuolar (PVC, *prevacuolar compartment*) que esta definido como una organela que recibe las proteínas desde las vesículas secretorias y posteriormente las transporta a las vacuolas (Bethke *and* Jones,

2000). Basados en los sistemas de endomembranas de levaduras o mamíferos, este funciona además como organela intermediaria en la vía endocítica desde la membrana plasmática al Golgi (Lemon *and* Traub, 2000) así como también, ha sido identificado como el Compartimiento Pre-Lisosomal (PLC, *prelisosomal compartment*) (Duna *et al.*, 1986; van Deurs *et al.*, 1993). En semillas en desarrollo de arveja, el cuerpo multivesicular (MVB, *prevacuolar multivesicular body*), que contiene proteínas de reservas, ha sido postulado con una función similar a PVC en el transporte hacia las vacuolas de almacenamiento de proteínas (PSV, *Protein Storage Vacuols*) (Robinson *et al.*, 1998) (Otegui *et al.* 2006).

Continuando con la descripción de las organelas que conforman el sistema, encontramos las vacuolas. Son el compartimiento clave en la célula vegetal, realizando muchas funciones vitales y esenciales para la planta, como por ejemplo mantienen la turgencia, homeostasis protoplasmática y, almacenan tanto metabolitos secundarios como proteínas que luego son degradadas para proveer carbono, nitrógeno y fuente de azufre tanto para el crecimiento como para el desarrollo de la planta (Marty, 1999). Las vacuolas tienen diferentes formas, tamaño, contenido y función; fueron descritas inicialmente por observación microscópica y luego a través de análisis bioquímicos, en distintas plantas y tejidos. Como se mencionó anteriormente, a diferencia de las células de levadura o mamíferos, las plantas presentan al menos dos tipos de vacuolas funcionalmente distintas: vacuolas líticas, halladas mayormente en células vegetativas y, vacuolas PSV, descritas inicialmente en cotiledones y endosperma de semilla (Hoh *et al.*, 1995; Paris *et al.*, 1996; Vitale *and* Raikhel 1999; Herman *and* Larkins, 1999) (Figura 3). El transporte de proteínas solubles y de membranas entre estas organelas esta mediado por distintas vesículas de transporte, donde cada una mantiene una composición única de su membrana y de las proteínas que transporta. Entre ellas podemos mencionar, las vesículas que median el transporte entre el ER y el GA, denominadas COP's (COP-I y COP-II, *coat protein complexes I y II*, respectivamente) o también, las encargadas del transporte desde estas organelas y su destino final como las vesículas cubiertas de clatrina (CCV, *Clathrin-Coated Vesicles*), las vesículas PAC (*Precursor Accumulating vesicles*) descritas en zapallo (*Cucurbita maxima*) (Hara-Nishimura *et al.* 1998) y, las vesículas densas (DV, *Dense Vesicles*) (Hillmer *et al.* 2001), entre otras (Vitale *and* Hinz 2005).

2.2. El transporte de moléculas en la vía secretoria

Las proteínas dirigidas al sistema de endomembranas contienen una secuencia N-terminal llamado péptido señal (SP, *Signal Peptide*). Al iniciarse la traducción del mRNA, todas las proteínas nacientes se unen a ribosomas citosólicos libres; no obstante, aquellas que serán incorporadas en la vía secretoria, el SP interacciona con la partícula de reconocimiento de señal (SRP, *signal recognition particle*) y suspende o retarda la traducción hasta que el complejo ribosoma-mRNA-proteína naciente-SRP se une a un complejo en la membrana del ER, dirigiendo la proteína en síntesis hacia el lumen de este. Una vez que se establecieron estas interacciones, el SRP se suelta y el ribosoma reanuda la traducción (Walter *et al.*, 1981). La secuencia SP es clivada ni bien ingresa al lumen del ER, esta remoción es esencial para el correcto plegado del dominio N-terminal de la nueva proteína. Los pasos siguientes son una cascada de interacciones entre la proteína en proceso de síntesis y las chaperonas que se encuentran en el lumen del ER que, no sólo estabilizan la estructura nativa de la proteína, sino también facilitan la formación de uniones disulfuro, incorporación de glicanos, etc. (Hartl, 1996; Fink, 1999).

Una vez completada la síntesis de la proteína, esta suele interactuar con receptores de la membrana y, en el sitio de interacción, se desencadena la formación de las vesículas COP-II que realizan el transporte anterógrado (hacia adelante) en la vía secretoria, transportando la proteína recién sintetizada desde el ER al GA. Estas vesículas se forman por polimerización del complejo de proteínas solubles de cubierta (COP's) en los sitios de salida de la membrana del ER (ERES: *endoplasmic reticulum exit sites*). Las proteínas que no han alcanzado la estructura nativa y las proteínas residentes del ER, como las chaperonas, que suelen ser transportadas al GA, son recuperadas al ER por medio de otras vesículas denominadas COP-I en lo que se conoce como transporte retrógrado (hacia atrás). Sin embargo, si la proteína recién sintetizada no logra adquirir la estructura tridimensional correcta, permanece unida a BiP (*immunoglobulin binding protein*), una chaperona de la familia HSP (*heat shock proteins*) y se activa la respuesta UPR (*unfolded protein response*) por la cual, la proteína es exportada fuera del ER para ser degradada por el proteosoma. Los componentes que reconocen la secuencia SP, COPI, COPII, chaperonas y componentes de la respuesta UPR, están altamente conservados en eucariotas (Alberts, 2008).

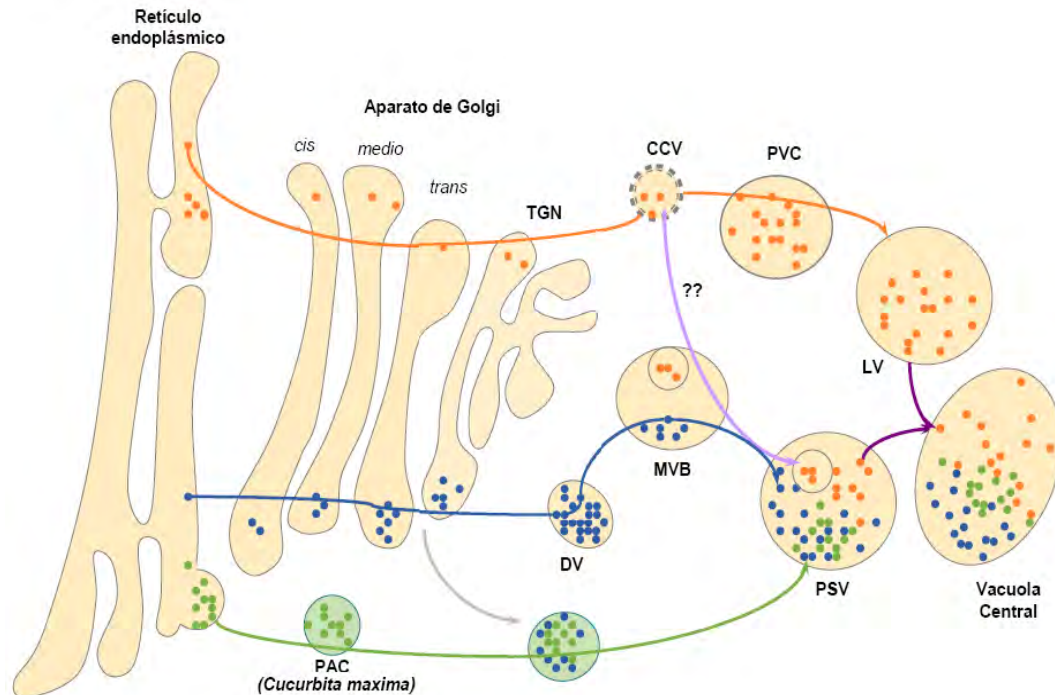


Figura 4: Funcionamiento general de la vía secretoria. Las proteínas (puntos azul, naranja y verde) llegan a LV desde el ER por una vía Golgi dependiente por medio de las vesículas CCV (flecha naranja), en cambio el transporte de proteínas a PSV desde el ER es por medio de las DV de manera Golgi dependiente (flecha azul) o, en el caso de semillas de zapallo (*Curcubita maxima*) por una vía golgi-independiente a través de las vesículas PAC (flecha verde). En células maduras, vacuolas (PSV y LV) se fusionan en la vacuola central (flechas violetas). Las referencias son citadas en el texto.

La proteína recién sintetizada sigue su camino a través del GA y, la ausencia de otras señales de direccionamiento hace que sea secretada, camino conocido como *default pathway* (Denecke *et al.*, 1990). Si la proteína es de membrana, suele tener un dominio transmembrana que la ancla al sistema de endomembranas (Vitale *and* Raikhel 1999). Si se trata en cambio, de una proteína cuyo destino final son vacuolas, presenta al menos una de las tres clases descritas de señales de direccionamiento vacuolar (VSS, *vacuolar sorting signals*): determinantes secuencia específica (ssVSS: *sequence specific VSS*), secuencias C-terminales (ctVSS *C-terminal determinants VSS*), y/o determinantes físicos (psVSS: *physical structure VSS*) (Tabla 4). Las proteínas destinadas a vacuolas líticas son transportadas en CCV por una vía que atraviesa compartimientos prevacuolares líticos y en las que intervendría homólogos del receptor de direccionamiento vacuolar (VSR, *vacuolar sorting receptor*), como el receptor de arveja (*Pea sativum*) BP-80 / *Arabidopsis thaliana*-VSR1, que reconoce ssVSS como por ejemplo NPIRL/NPIXL en la proteína a ser transportada (Matsuoka *and* Neuhaus 1999, Vitale *and* Raikhel, 1999, Ahmed *et al.*, 2000). Para el transporte a vacuolas de reserva

tanto la presencia de determinantes ctVSS y/o psVSS serían importantes (Vitale *and* Hinz, 2005). Aunque existe evidencia que apoya la intervención de VSRs en este último mecanismo (Vitale *and* Hinz, 2005; Park *et al.*, 2005; Nishimura *et al.*, 2003) hay dos familias de receptores candidatos que apoyan distintos modelos y que deben ser revisados ya que los anticuerpos empleados reconocían más de una clase de receptores y por otro lado, se ha propuesto que los mecanismos de transporte no solo serían especie específicos sino también tejido específicos.

Tabla 4. Distintas señales de direccionamiento vacuolar identificadas.

Proteína	Secuencia	Señal	Localización	Observación	Referencia
Albumina 2S (<i>Curcubita maxima</i>)	KARNLPSMCGIRPQRDCF	ssVSS	PSV	Cterminal	Shimada y col., 2002
β -faseolina (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	AFVY	ctVSS	PSV	Cterminal	Frigerio y col., 1998
Subunidad α de β -conglucina (<i>Glicine max</i>)	PLSSILRAFY	ctVSS	PSV	Cterminal	Nishizawa y col., 2003
Albumina 2S (<i>Ricinus communis</i>)	STGEEVLRMPGDEN	ssVSS	PSV	Interno	Joliffe y col., 2004
Aleurina (<i>Hordeum vulgare L</i>)	SSSFADSNPIR	ssVSS	LV	Nterminal	Neuhaus y col., 1998
Lectina (<i>Hordeum vulgare L</i>)	VFAEAIAANSTLVAE	ctVSS	PSV	Cterminal	Neuhaus y col., 1998
Legumina tipo B (<i>Vicia faba</i>)	Segmentos multiples	psVSS	PSV	Interno	Neuhaus y col., 1999
Albumina 2S (<i>Bertholletia excelsa</i>)	IAGF	ctVSS	PSV	Cterminal	Saalbact y col., 1991
Esporamina (<i>Solanum tuberosum</i>)	HSRFNPIRLPTTHEPA	ssVSS	PSV	Nterminal	Kirsch y col. 1996; Neuhaus y col., 1998
Fitohemaglutinina (<i>P. vulgaris</i>)	Dominio interno	psVSS	PSV	Interno	Von Schaewen y col., 1993
Albumina 2S (<i>brazil nut</i>)	AFVY	ctVSS	PSV	Cterminal	Frigerio y col., 1998
Ricina (<i>Ricinus communis</i>)	SLLRPVVPNFN	ssVSS	PSV	Interno	Joliffe y col., 2004
Esporamina (<i>Ipomoea batatas</i>)	NPIRL/P	ssVSS	LV	Nterminal	Matsuoka y col., 1999
Quitinasa A (<i>N tabacum</i>)	GLLVDTM	ctVSS	PSV	Cterminal	Neuhaus y col., 1991

Referencias: (VSS, *vacuolar sorting signals*): determinantes secuencia específica (ssVSS: *sequence specific VSS*), secuencias C-terminales (ctVSS *C-terminal determinants VSS*), y/o determinantes físicos (psVSS: *physical structure VSS*) en proteínas de reserva y su localización subcelular nativa: PSV (*proteins storage vacuols*) o LV (*litic vacuols*). Adaptado de Vitale *and* Hinz (2005), Vitale *and* Raikhel (1999) y Matsuoka *and* Neuhaus (1999).

2.3 Otras proteínas importantes en la vía secretoria

La chaperona mejor caracterizada, tanto en células en animales como plantas, es la proteína glucosa-regulada 78 (GRP78) de la familia de HSP70, comúnmente llamada Proteína de Unión o BiP, como fuera mencionada en la sección anterior (Boston *et al.*, 1996). En plantas, la interacción con BiP se ha descrito principalmente en el contexto de proteínas de almacenamiento en semillas, como la faseolina de arveja y prolamina de cereales. Se ha mostrado que la interacción del monómero de faseolina naciente con BiP, ayuda al ensamblado en trímeros (Vitale *et al.*, 1995). En endosperma de arroz,

BiP fue encontrada asociada con prolaminas desde el inicio hasta el final de la maduración y deposición dentro de los cuerpos proteicos (PB) (Li *et al.*, 1993). Todavía se desconoce si BiP participa en la formación de los cuerpos de prolamina promoviendo la agregación de la proteína o solamente asistiendo al plegado, ya que desde el inicio BiP ha sido detectado en la periferia de los cuerpos de prolamina pero no dentro. Otra chaperona importante en la vía, es la que cataliza la formación de los puentes disulfuro intra e intercatenarios y que a menudo son requeridos para el correcto plegado de las proteínas. Aunque el entorno oxidante del lumen del ER promueve este proceso, por si mismo no es suficiente. Por lo tanto, existe la chaperona PDI (*protein disulfide isomerase*), residente en ER, que cataliza la formación de uniones disulfuro entre los residuos de cisteína (Freedman, 1989). Como la mayoría de las chaperonas, PDI ha sido mas extensivamente estudiada en células de animales. Llama la atención que esta chaperona tiene una concentración muy alta en células de animales alcanzando hasta un 0.4% de las proteínas celulares totales (Noiva *and* Lennarz, 1992).

Por otro lado, encontramos las proteínas ligadas a membrana calreticulina y calnexina, son dos lectinas estrechamente relacionadas a proteínas residentes del ER, que fueron identificadas inicialmente en animales (Helenius *et al.*, 1997). Estas, se asocian al péptido nascente desde el comienzo del proceso de plegamiento. Al igual que BiP y otras chaperonas, sirven como anclas de retención para prevenir la salida del ER de las glicoproteínas desplegadas o mal plegadas, siendo un claro ejemplo de control de calidad de las chaperonas del ER. Mientras que BiP se liga a regiones hidrofóbicas, calnexina y calreticulina lo hacen específicamente a glicoproteínas que poseen glicanos N-ligados, plegadas incompletamente. A menos que estén correctamente plegadas, calnexina y calreticulina retienen la glicoproteínas reciclándola dentro del lumen del ER. Varios homólogos de estas dos lectinas fueron identificadas en diferentes plantas, como espinaca (Menegazzi *et al.*, 1993), maíz (Kwiatkowski *et al.*, 1995; Napier *et al.*, 1995), arabidopsis (Huang *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1997), y arveja (Hassan *et al.*, 1995).

En la actualidad, varios de los receptores que se unen a los determinantes específicos de direccionamiento vacuolar (VSR, *vacuolar sorting receptors*), han sido identificados. Por ejemplo, la proteína transmembrana tipo I (BP-80) de arveja que fuese citado anteriormente, como receptor de direccionamiento vacuolar putativo

(Kirsch *et al.*, 1994). Curiosamente, BP-80 no se une a proteínas que contienen determinantes C-terminal de direccionamiento vacuolar (Kirsch *et al.*, 1994), dando una fuerte evidencia sobre la existencia de dos vías separadas a vacuola dependiendo de la secuencia de direccionamiento de la proteína. Sin embargo, en *Arabidopsis* se mostró que el At-VSR-1 interacciona con determinantes ubicados en el extremo C-terminal de proteínas de reserva y que el *knock-out* produce la secreción de estas proteínas por lo que este receptor podría intervenir en el transporte tanto a vacuolas líticas como a PSV (Shimada *et al.*, 2003). A este receptor también se le ha asignado un rol en la movilización de proteínas durante la germinación (Wang *et al.*, 2007). Además de la familia de los VSRs, que en *Arabidopsis* tiene siete miembros, hay otro grupo de receptores denominados RMR (*Receptor homology-transmembrane-RING H2*) que participa en el transporte a vacuolas (Jiang *et al.*, 2000; Jiang and Rogers 1998; Shimada *et al.*, 2003). También, el transporte de proteínas a vacuolas parece depender de varios factores incluyendo propiedades intrínsecas del polipéptido, el determinante vacuolar y la vacuola blanco (Castelli and Vitale 2005, Holkeri and Vitale 2001, Park *et al.* 2007; Craddock *et al.* 2008). Asimismo, el descubrimiento de las distintas proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIP, *tonoplast intrinsic proteins*), ha permitido avanzar en el estudio de la función y biogénesis de las vacuolas, ya que las mismas son empleadas como marcadores de los distintos tipos vacuolares (Johnson *et al.*, 1989; Hofte *et al.*, 1992). Así, γ -TIP es encontrada abundantemente en el tonoplasto de vacuolas líticas, α -TIP se halla específicamente en vacuolas PSV, en tejidos de almacenamiento, mientras que tejidos vegetativos las membranas que rodean a las PSVs contienen δ -TIP (Neuhaus and Rogers, 1998). Sin embargo, las distintas TIPs no se distribuyen de la misma manera en diferentes tejidos y especies por lo que se requiere de un mayor conocimiento de su distribución para poder identificar fehacientemente los distintos tipos vacuolares (Bethke and Jones 2000, Bethke *et al.* 1998).

3. N-glicosilación en plantas

3.1. Maduración de N-glicanos dentro de la vía secretoria

La mayoría de las proteínas de superficie y secretorias de las células están glicosiladas; por ello, la N-glicosilación es la mayor modificación post-traduccional en proteínas. Sin embargo, no todos los sitios de N-glicosilación son utilizados, estimándose que el 10-

30% de los sitios potenciales no son glicosilados, principalmente debido a rasgos estructurales (Dwek, 1996). La glicosilación de proteínas es un proceso temprano que ocurre co-traduccionalmente (Bollini *et al.*, 1983) comenzando con la transferencia de un polisacárido precursor $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, derivado de un lípido dolicol anclado a la membrana del ER, al polipéptido naciente (Lis *and* Sharon, 1993). El precursor es adicionado al residuo de asparagina del péptido específico Asn-Xaa-Ser/Thr, donde Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico (Kornfeld *and* Kornfeld, 1985). La transferencia está catalizada por la oligosacaril-transferasa y, el proceso continúa con una cascada de modificaciones no sólo en el lumen ER, sino también en GA, en la vacuola y eventualmente en el apoplasto (Figura 5). Una de estas modificaciones es la eliminación de tres unidades de glucosa, catalizada por glucosidasa I y II ubicadas en el lumen del ER (Lerouge *et al.*, 1998) y que producen un oligosacárido denominado “rico en manosa”, terminología empleada para todas aquellas formas que tienen entre cinco y nueve manosas. La eliminación de manosas empieza en el ER generándose las glicofomas ricas en manosa $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ($\text{Man}_9\text{-Man}_8$) (Gomord *et al.* 2004, Lerouge *et al.* 1998a). Como se ilustra en la Figura 5, las modificaciones posteriores tienen lugar en el GA donde el oligosacárido es reducido a tres manosas terminales y posteriormente se inicia la incorporación de nuevos residuos glucocídicos por acción de las N-acetilglucosaminil-transferasas I y II (GNT I/II) que agrega una molécula de GlcNAc en cada extremo de los dos brazos del glicano (glicano denominado biantenarico). Un rasgo específico de las glicoproteínas de plantas es la fucosilación $\alpha(1,3)$ y xilosilación $\beta(1,2)$ del armazón de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ catalizado por la $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferasa ($\alpha(1,3)$ -FucT; Staudacher *et al.*, 1995) y $\beta(1,2)$ -xilosiltransferasa ($\beta(1,2)$ -XylT; Zeng *et al.*, 1997), ocurre en el *trans*-GA. La adición de estos dos últimos azúcares no ocurre en mamíferos, aunque si se produce una fucosilación $\alpha(1,6)$ y además, la adición de galactosa y ácido siálico en los extremos de ambos brazos del glicano biantenarico (Raju *et al.*, 2000). Una posterior modificación de los oligosacáridos unidos a la proteína puede ocurrir en el espacio extracelular o en la vacuola. En esta última, los dos residuos N-acetilglucosamina son removidos (Vitale *and* Chrispeels, 1984) y, la glicofoma vacuolar generalmente queda con la estructura $\text{Man}_3(\text{Xyl})(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$ (Gomord *et al.*, 2004, Lerouge *et al.*, 1998) (Figura 5).

Otras estructuras de glicanos se han caracterizado en suspensiones celulares de *Vaccinium myrtillus* (Melo *et al.*, 1997; Fitchette-Lainé *et al.*, 1997) conteniendo un

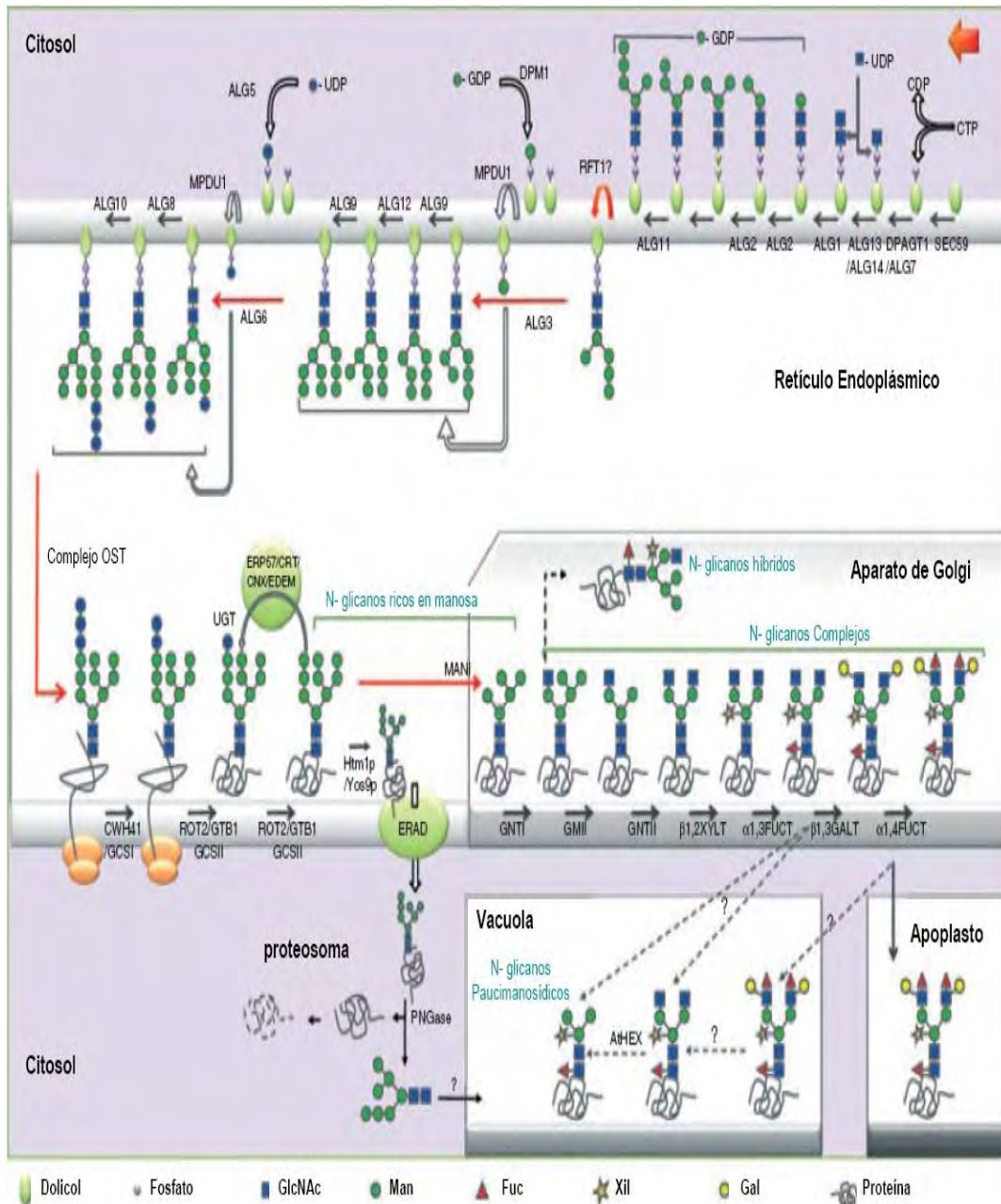


Figura 5: Procesamiento de N-glicanos en la vía secretoria de plantas, desde el ER, A. de Golgi al apoplasto o vacuolas. En cada flecha se indica la o las enzimas que participan en la reacción. Man: manosa, Fuc: fucosa, Xil: xilosa y Gal: galactosa. Para más referencias ver en el texto. Adaptado de Gomord *et al.*, 2010.

epitope conocido como Lewis^a (Le^a), el mismo corresponde a la adición de un motivo Galβ(1-3)[Fucα(1-4)] a uno o ambos residuos GlcNAc del glicano biantenarico (Figura 5). En mamíferos, la estructura de Lewis^a se conoce como responsable del reconocimiento célula-célula (Feizi, 1993) y, de participar en los grupos histológicos sanguíneos (Henry *et al.*, 1995). Los motivos de Lewis^a son agregados en el *trans*-Golgi y por lo tanto presentes en la mayoría de glicoproteínas extracelulares. Esta forma de N-

glicanos no se encuentra en la mayoría de las proteínas vacuolares indicando que es probablemente hidrolizada por glicosidasas ubicadas en la vía de transporte a la vacuola o bien dentro de ella (Fitchette *et al.*, 1999). Curiosamente, el glicano de Lewis^a no se halla en todas las plantas, en la familia *Cruciferae* (coliflor, nabo y rábano) no se produce una cantidad detectable de glicoproteínas que lleven el glicano de Le^a (Fitchette *et al.*, 1999). La presencia del glicanos de Le^a junto con la de residuos de xilosa β 1,2 y fucosa α 1,3 (modificaciones ausentes en mamíferos) podría transformar a las glicoproteínas, producidas en plantas, en inmunogénicas y/o alergénicas (Bardor *et al.* 2003, Gomord *et al.* 2005, van Ree *et al.* 2000).

3.2. El impacto de la N-glicosilación en el plegado y actividad de las proteínas

La N-glicosilación puede influir en el plegado, solubilidad, estabilidad y actividad de las proteínas. Para probar este impacto, se han utilizado diferentes enfoques, como el uso del antibiótico tunicamicina que inhibe la síntesis del precursor de glicanos (Faye and Chrispeels, 1989) o, el estudio de glicoproteínas donde el sitio de N-glicosilación ha sido removido por mutagénesis sitio dirigida. Varias proteínas candidato, han sido secretadas bajo estas condiciones (Ravi *et al.*, 1986; Faye and Chrispeels, 1987; Driouich *et al.*, 1989; Cordewener *et al.*, 1991; Duranti *et al.*, 1995), en lugar de ser retenidas en el ER (Faye and Chrispeels, 1987) o han formado agregados (Ceriotti *et al.*, 1998). Sin embargo en algunos casos las proteínas no-glicosiladas fueron correctamente dirigidas y permanecieron activas (Sonnewald *et al.*, 1990; Wilkins *et al.*, 1990; Bustos *et al.*, 1991; Santino *et al.*, 1992). Estas diferencias, demuestran que la N-glicosilación es crucial para el plegado, el direccionamiento y la actividad pero es dependiente de tipo de glicoproteína. De hecho, se ha demostrado que la síntesis de la chaperona BiP, aumenta cuando se aplica tunicamicina en células de planta (Denecke *et al.*, 1991; D'Amico *et al.*, 1992; Koizumi, 1996) y, que la asociación de BiP ocurre aún en proteínas sin glicanos (Pedrazzini *et al.*, 1997). Este incremento en los niveles de la chaperona, es generalmente observado en presencia de polipéptidos anormales (Gillikin *et al.*, 1997) indicando que la inducción de la síntesis de BiP, bajo tratamiento de tunicamicina, refleja la acumulación de proteínas mal plegadas en el ER (Ceriotti *et al.*, 1998). De hecho, ha sido propuesto que la falta de glicanos produce una falla en el plegado correcto y subsecuentemente degradación (Pedrazzini *et al.*, 1997).

El efecto de la N-glicosilación en la estabilidad y actividad son dependientes de la proteína en cuestión. Algunas glicoproteínas recombinantes que han sido expresadas en bacterias como un derivado a-glicosilado sin pérdida significativa de actividad (Rosenberg *et al.*, 1984). Sin embargo, esto es diferente para otras glicoproteínas, donde se ha observado que al expresar glicoproteínas en *E. coli* dicha actividad decrece o es nula (Phillippy and Mullaney, 1997). Estudios más precisos en glicoproteínas con el sitio de glicosilación mutado, han sido realizados en sistemas heterólogos mostrando el efecto de las mutaciones en los sitio específicos de N-glicosilación con el plegado, tráfico y actividad de la proteína. Por ejemplo, Eckhardt y colaboradores (2002) mostraron que la falta de la Asn-312 en el sitio de glicosilación de la galactosilceramida sulfotransfera murina, producía niveles muy bajos de acumulación de la misma. Además, que cuando el residuo de Asn-66 del mismo sitio era mutado, se observaba una reducción del 50% de la actividad *in vitro* de la proteína (Eckhardt *et al.*, 2002). Otros estudios, demuestran que la sustitución del sitio Asn-286 en la Tripeptidil-peptidasa I humana, dramáticamente afectaba el plegado de la enzima resultando la pérdida de actividad y estabilidad a pH. Sin embargo, la sustitución de cualquiera de los otros posibles sitios de glicosilación, no afectaba ninguna de estas características (Wujek *et al.*, 2004). Por lo tanto, la N-glicosilación influye en el plegado de algunas glicoproteínas pero no de todas. En el caso de proteínas terapéuticas la glicosilación suele ser un factor determinante de la duración de la vida media en sangre y la ausencia de ácido siálico (modificación que no se produce en plantas) acelera la captación y eliminación en orina (Paccalet *et al.* 2007).

3.3 Alergenicidad de glicanos de plantas

A pesar de que las plantas producen proteínas que poseen N-glicanos complejos con un armazón de trimanosas ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) semejante a mamíferos, este armazón está frecuentemente sustituido con residuos de xilosa ligados por uniones β 1,2 y/o residuos de fucosa ligados por uniones α 1,3 , contrario a lo que ocurre en células de mamíferos en donde los residuos de fucosa están unidos por uniones α 1,6 (Lerouge *et al.* 1998). La presencia de estos glicanos, tanto como las estructuras Lewis^a, han llamado la atención de numerosos científicos a causa del potencial riesgo de una reacción alérgica que implicaría la inyección de biofármacos producidos en plantas. Se ha demostrado, que α (1,3)-fucosa y β (1,2)-xilosa constituyen el epítipo de unión a IgG

y por lo tanto es potencialmente alergénico (Faye *and* Chrispeels, 1988; Garcia-Casado *et al.*, 1996; Van Ree *et al.*, 2000). La inmunización de cabras (Kurosaka *et al.*, 1991) y conejos (Faye *et al.*, 1993) se ha llevado a cabo para la producción de anticuerpos específicos contra los epitopes de glicanos conteniendo $\beta(1,2)$ -xilosa y $\alpha(1,3)$ -fucosa. Adicionalmente, estudios realizados recientemente demuestran que estos glicanos específicos de plantas, además de producir la reacción de unión a epitopes IgG, desencadenan la liberación de histaminas por células basófilas humanas en algunos pacientes. Contrariamente, los resultados de Chargelegue y colaboradores, sugieren que al inyectar ratones BALB/c con un anticuerpo monoclonal producido en plantas de tabaco, conteniendo estos glicanos específicos, los mismos no fueron inmunogénicos (Chargelegue *et al.*, 2000) aunque también se ha informado que los ratones no serían un buen modelo para estudiar la respuesta inmune a carbohidratos (Jin *et al.* 2006) y que se obtienen resultados diferentes al emplear conejos (Jin *et al.* 2008). Estos datos demuestran que es necesario realizar más investigaciones sobre las glicoproteínas terapéuticas producidas en plantas, en cuanto a la inmuno-alergenicidad característica requerida para la industrialización.

4. La semilla como órgano de almacenamiento

4.1 Estructura general de las semillas

Las semillas de plantas se clasifican en tres grandes categorías de acuerdo a su estructura: semillas monocotiledóneas (por ejemplo cereales), semillas dicotiledóneas endospermicas (ejemplo tomate, tabaco y cebolla) y, semillas dicotiledóneas no-endospermicas (*A. thaliana*, legumbres). Estructuralmente las semillas poseen un embrión con uno o dos cotiledones (de ahí la denominación monocotiledóneas o dicotiledóneas, respectivamente), el endosperma, el tejido aleurónico (que puede comprender una o varias capas de células) y, la cubierta de la semilla o testa. El mayor rol del endosperma es la provisión de nutrientes al embrión (Lopes *and* Larkins, 1993). En semillas dicotiledóneas no endospermicas, el embrión ocupa la mitad del volumen de la semilla y esta rodeada por 3 a 5 capas de células de endosperma (Figura 6a). En semillas de legumbres, el endosperma es muy reducido y se encuentra en la periferia (Figura 6b); de hecho, durante la maduración de la semilla, los dos cotiledones absorben la mayoría de los nutrientes del endosperma, hasta que finalmente constituyen la casi

totalidad de la semilla (Marinos, 1970). Contrariamente, las plantas dicotiledóneas muestran un tejido endospermico prominente que representa el 90% de la semilla y un pequeño embrión (Figura 6c). Todos los tejidos de semillas tienen como función el almacenamiento (conteniendo minerales, proteínas, almidón y triglicéridos). Las semillas de legumbres pueden contener hasta un 45% de su peso seco de proteínas, mientras que las de cereales contienen solo el 16% siendo su principal reserva los hidratos de carbono.

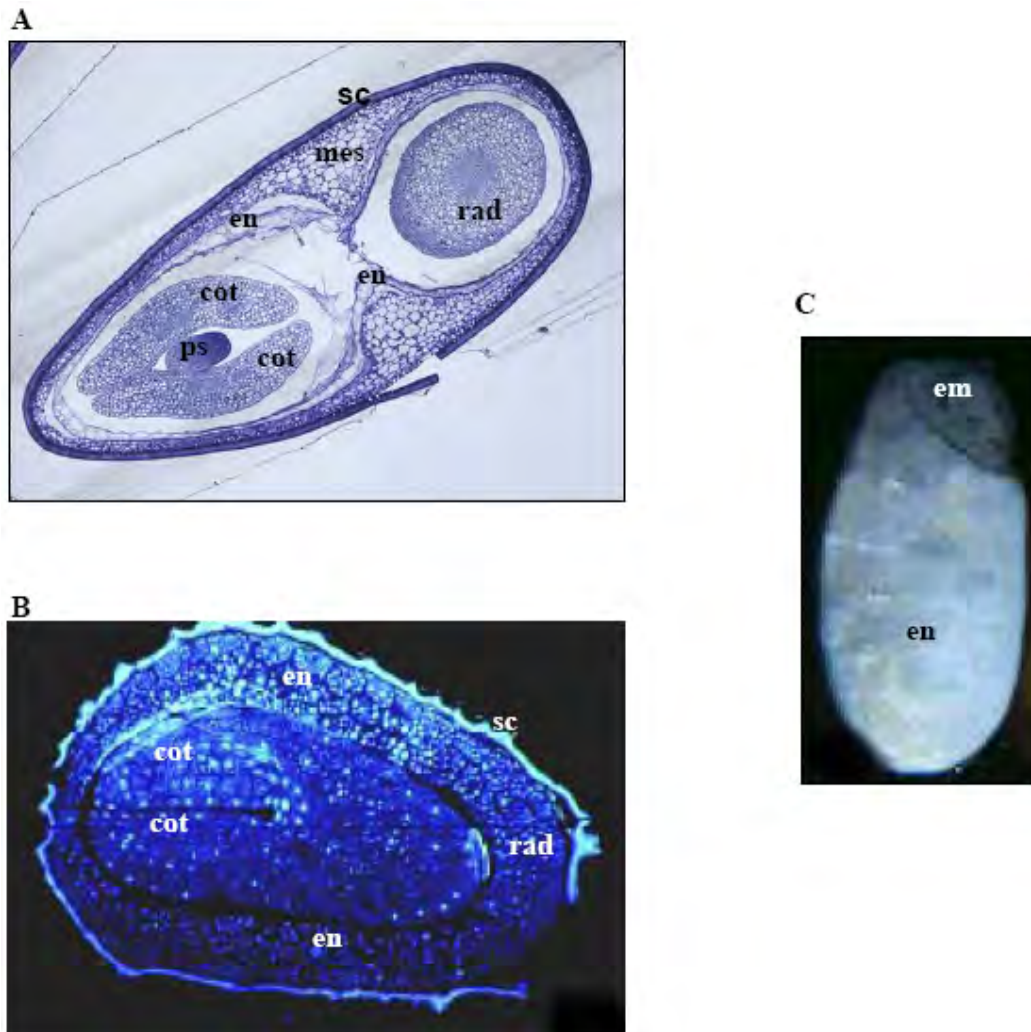


Figura 6: Ilustración de la anatomía de semillas de tres diferentes clases de plantas. **(A)** corte de sección semilla de *Medicago truncatula* (dicotiledónea no endospermica), **(B)** corte de sección de semilla de *Nicotiana tabacum* (dicotiledónea endospermica) y **(C)**, corte de sección de semillas de *Oriza sativa* (monocotiledónea). **PS** indica tallo plumulado, **RAD:** radícula, **SC:** cubierta de la semilla, **COT.** cotiledón, **en:** endosperma y **em:** embrión. Adaptado de Tomlinson y col. (2004).

En las semillas de distintas especies vegetales, se han descrito dos clases diferentes de órganos de reserva: los cuerpos proteicos (PB), que son típicos de cereales y, las vacuolas de reserva PSV (Figura 3). Estos compartimentos aunque tienen la característica de acumular proteínas de reserva son diferentes entre si: los PB son

derivados del ER por lo que tienen en su superficie ribosomas y acumulan proteínas que se insolubilizan (prolaminas) en el ER por lo que no pueden ser transportadas; en cambio, los PSV carecen de ribosomas y suelen almacenar globulinas (Herman *and* Schmidt, 2004; Herman, 2008) (Figura 3).

4.2 Proteínas de almacenamiento de semillas

4.2.1 Clasificación de proteínas

Las proteínas de almacenamiento de semillas se acumulan en niveles altos en tejidos específicos, como endosperma y cotiledones siendo su principal función biológica la de constituir una reserva de carbono y nitrógeno al ser empleada durante la germinación y primeros estadios de desarrollo de la plántula hasta que los órganos fotosintéticos sean funcionales. Las mismas se integran al sistema de endomembranas por la inserción co-traducciona l en el lumen del ER, siguiendo diferentes rutas hasta su destino final (Müntz, 1998). En 1924, Osborne clasificó a las proteínas de almacenamiento de acuerdo a su solubilidad en distintos solventes: en agua (albúminas), soluciones salinas (globulinas), mezclas de alcohol/agua (prolaminas) y soluciones ácidas o alcalinas (gluteínas). Mientras que las albúminas y globulinas son ampliamente distribuidas en semillas de dicotiledóneas, las prolaminas son específicamente encontradas en cereales. Las albúminas son generalmente proteínas globulares y en muchos casos corresponden a proteínas que actúan en la defensa de la semilla como inhibidores de tripsina, hemaglutininas, etc (Muntz, 1996; 1998). Las globulinas representan la más extensa distribución de proteínas de almacenamiento, encontrándose tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas y aunque estructuralmente son similares son clasificadas bases a su coeficiente de sedimentación: globulinas 7S y 11S. Entre las globulinas 11S podemos mencionar la glutelina de arroz (*Oriza sativa*), triticina de trigo (*Triticum aestivum*), legumina de arveja (*Pisum sativum*) y, las glicininas de soja (*Glycine max*) caracterizándose también por presentar una estructura polimórfica. Entre las globulinas 7S se encuentran la faseolina de frijol (*Phaseolus vulgares*), vicilina del frijol ancho (*Vicia faba*) y cruciferinas de semillas de colza (*Brassica napus*) (Shewry *and* Casey, 1999) Las globulinas 7S suelen estar glicosiladas (Müntz, 1998). De las tres clases de proteínas de almacenamiento, las prolaminas, que se encuentran en hierbas y cereales, representan la mayoría de las proteínas en cereales,

alcanzando hasta un 50% del contenido de proteínas (Boyer *et al.*, 1992). La excepción es el arroz, en donde el 75-80% de sus proteínas de almacenamiento son globulinas, (Zheng *et al.*, 1995).

4.2.2 Tráfico y deposición de proteínas de reserva en semillas

Como se menciona en la sección anterior, la función de las proteínas acumuladas en la semilla es proveer fuente de carbón, nitrógeno y azufre para la germinación de la plántula. Las mismas, son transportadas a través de rutas específicas en el sistema de endomembranas, que difieren del seguido por las proteínas cuyo destino final es vacuolas líticas (Müntz, 1998). Las albúminas y globulinas se mueven desde el lumen del ER hasta el Golgi desde donde son transportadas a PSVs, en las vesículas densas (DV) (Hohl *et al.*, 1996). Sin embargo, en semilla de zapallo se observa una excepción a esta regla ya que las globulinas 11S y albúminas 2S son transportadas en las vesículas PAC que se desprenden directamente del ER (Hara-Nishirama *et al.*, 1998). Tanto las globulinas 7S como 11S forman trímeros (homo y heterotrimeros) en el ER y los trímeros son incluidos en las vesículas COP II que las transportan al AG (Jung *et al.* 1998; Jung, *et al.*, 1998, Otegui *et al.* 2006b; Park *et al.* 2004). En su tránsito a la vacuola de almacenamiento de semilla, sufren un clivaje proteolítico mediante las enzimas de procesamiento vacuolares (VPE) lo que genera las formas maduras de las globulinas 7S y 11S y que, en el caso de las globulinas 11S desencadena la formación de estructuras hexaméricas (Hara-Nishirama *et al.*, 1991; 1993; Jung *et al.*, 1998; Otegui *et al.*, 2006). En semillas de cereales, las globulinas son depositadas en PSV luego de pasar por el Golgi, siguiendo la ruta descrita anteriormente, en cambio las prolaminas, se depositan directamente en el lumen del ER, dando origen a los llamados cuerpos proteicos (PB). (Arcalis *et al.* 2004, Pompa and Vitale 2006). La formación de uniones disulfuro en el ER juega un rol importante en la acumulación de prolaminas (Kawagoe *et al.* 2005).

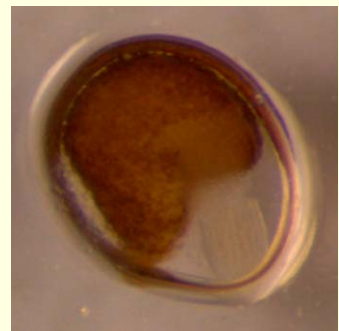
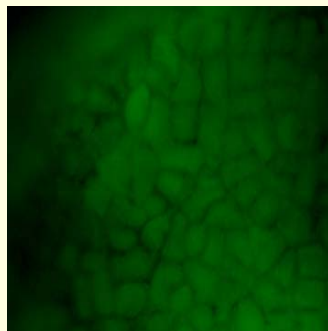
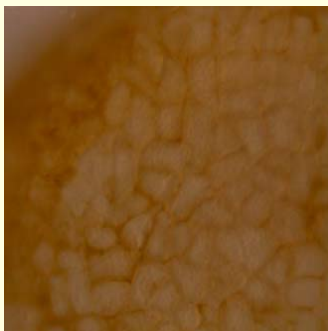
En secciones anteriores se describieron algunas de las características que presentan las proteínas que son dirigidas a vacuolas de reserva y líticas que muchas veces funcionan como señales de direccionamiento discretas (Vitale and Hinz 2005). Sin embargo, es de destacar, que la alta tendencia de las proteínas de reserva a la agregación y la identificación de múltiples determinantes de direccionamiento vacuolar

han llevado a remarcar las características moleculares particulares de estas proteínas como un factor importante para su direccionamiento correcto (Castelli *and* Vitale 2005, Holkeri *and* Vitale 2001, Mori *et al.* 2009, Nishizawa *et al.* 2006; Foresti *et al.*, 2008). También es importante enfatizar que cuando estas proteínas son sintetizadas en hojas inducen la formación de estructuras que no se encuentran en condiciones normales (no transgénicas) (Hayashi *et al.* 1999). Teniendo en cuenta que la mayor parte de las globulinas de reserva son transportadas a vacuolas por una vía Golgi dependiente, en este trabajo se planteó la identificación de determinantes de direccionamiento vacuolar de una globulina 11S para utilizar esa señal como una estrategia para direccionar efectivamente una proteína de interés a órganos de reserva.

Por otro lado, teniendo en cuenta las diferentes rutas de transporte a vacuolas descritas en semillas y, las ventajas que podría tener la acumulación de una proteína de interés en este órgano (que ya han sido mencionadas en secciones anteriores), se planteó también el estudiar el transporte y acumulación de un anticuerpo completo en semillas de tabaco.



OBJETIVOS



OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

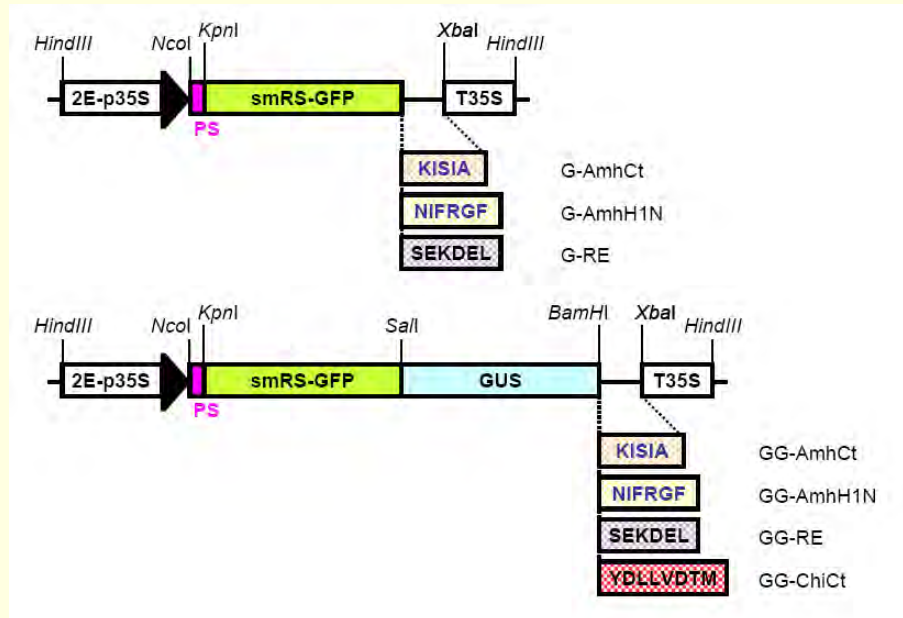
La utilización de plantas como biorreactores, en la producción de proteínas de interés, como vimos en secciones anteriores, presenta como principales inconvenientes que los niveles de acumulación logrados hasta ahora son muy bajos (menos de 1% de la proteína soluble total (Stoger *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2005; Petruccelli *et al.*, 2006) y, que el conocimiento de las modificaciones postraduccionales es escaso. Se ha propuesto que la hidrólisis de la proteína heteróloga podría ser uno de los factores que determina esos bajos niveles de acumulación. Las células vegetales poseen además de las vacuolas líticas, organelas con capacidad de almacenar proteínas y que han sido descritos en distintos tejidos y células en diversas condiciones fisiológicas (Paris *et al.*, 1996; Di Sansebastiano *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 1999). En este trabajo se plantea el tratar de aportar una solución al problema de la hidrólisis de la proteína de interés a través su direccionamiento a organelas donde podría almacenarse de manera estable. Por ello, se estudiará por un lado el empleo de la secuencia KDEL, que en hojas determina que la proteína de interés se acumule en el retículo endoplásmico, pero que en órganos de reserva podría dirigir a vacuolas de reserva de proteínas (PSV). Por otro lado, teniendo en cuenta que el mecanismo que determina el direccionamiento de proteínas de reserva a PSV aún se encuentra en etapas de esclarecimiento se estudiará si secuencias derivadas de una globulina 11S de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*) pueden emplearse con esta finalidad.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este plan de Tesis es tratar de incrementar los niveles de acumulación de una proteína foránea por direccionamiento a vacuolas de reserva en hojas y semillas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✦ Estudiar el direccionamiento de un anticuerpo catalítico con y sin fusión a la señal KDEL en distintos órganos.
- ✦ Analizar si existen diferencias en las modificaciones post-traduccionales de este anticuerpo fusionado a dos señales de direccionamiento, cuando se expresa en semilla.
- ✦ Evaluar la eficiencia de las señales KISIA o GNIFRGF, derivadas de la globulina 11S de amaranto, para dirigir las proteínas reporteras GFP-GUS a vacuolas en plantas como otra alternativa de señal de direccionamiento.



MATERIALES

Y

MÉTODOS

MATERIALES Y METODOS

1. Materiales

1.1 Reactivos químicos

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

Merck (Darmstadt, Alemania).

Mallinkrodt (New York, EE.UU.).

Sigma (St. Louis, EE.UU.).

QIAGEN Inc. (Valencia, EE.UU.)

Fluka (Buchs, Suiza).

Carlo Erba (Milán, Italia).

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

Sigma (St. Louis, EE.UU.)

New England Biolabs, NEB (Beverly, EE.UU.)

Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania)

Gibco BRL (Gaithersburg, EE.UU)

Stratagene (La Jolla, EE.UU.)

PIERCE (Pierce Biotechnology,

Promega (Madison, EE.UU.)

Rockford, Illinois EEUU)

Invitrogen (Carlsbad, CA)

1.2 Medios de cultivos para bacterias

Medio Luria-Bertani (LB): Triptona 10 g/L; Extracto de levadura 5g/L; NaCl 0,09 M; Glucosa $5,5 \cdot 10^{-3}$ M. Para lograr medios sólidos de cultivo se adicionó 15 g/L de agar (Merck).

Medio YEB: Triptona 10 g/L; Extracto de levadura 5g/L; Extracto de carne 5g/L; NaCl 0,09 M; Glucosa $5,5 \cdot 10^{-3}$ M. Para lograr medios sólidos de cultivo se adicionó 15 g/L de agar (Merck).

Medio PSI: Extracto de levaduras 5 g/L; Triptona 20 g/l; $MgSO_4$ 5 g/L; se ajusta el pH=7,0.

Medio SOC: Triptona 20 g/L; Extracto de levaduras 5 g/L; NaCl 0,6 g/L; KCl 0,2 g/L; MgCl₂ 0,95 g/L; MgSO₄ 1,2g/L; Glucosa 3,6 g/L.

1.3 Soluciones de antibióticos empleadas

Para selección de bacterias: todas las soluciones stock se prepararon a una concentración 1000 veces superior (1000X) a la de trabajo en agua excepto para los antibióticos tetraciclina y cloranfenicol para los que se empleó etanol 70%. En el caso de carbenicilina la solución stock fue 500X. Las concentraciones de las soluciones stock fueron: , Estreptomicina (Str) 50 mg/ml, Carbenicilina (Carb) 250 mg/ml, Ampicilina (Amp), 50 mg/ml; Tetraciclina (Tc) 10 mg/ml, Kanamicina (Kan) 50 mg/ml; Cloranfenicol (Chl) 30mg/ml; Gentamicina (Gn) 50 mg/ml.

Para selección de tejido vegetal: Kanamicina (Kan) Solución stock 1000X=100 mg/ml en H₂O, Higromicina B solución stock 1000X=50mg/ml en H₂O.

1.4 Cepas bacterianas

En primera instancia se utilizaron bacterias competentes químicas de *Escherichia coli* DH5α para clonar y amplificar las construcciones obtenidas y, posteriormente *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 electrocompetentes, para realizar agroinfiltraciones (expresión transitoria) o LBA 4404 electrocompetentes en la transformación de discos de hojas (expresión estable).

1.5 Vectores plasmídicos utilizados

1.5.1 Vectores de clonado: Como vector de clonado se utilizó el plásmido pRTL202 (Carrington et al., 1991), el cual posee el péptido señal de la cadena pesada de una inmunoglobulina secretoria de ratón (SP) (Figura 1).

1.5.2 Vectores binarios: Para las transformaciones mediadas por agrobacterias, se utilizó el vector binario pBLTi 121 (Gomord *et al.*, 1996) derivado del vector pBI121 (Pagny *et al.*, 1996)(Figura 2).

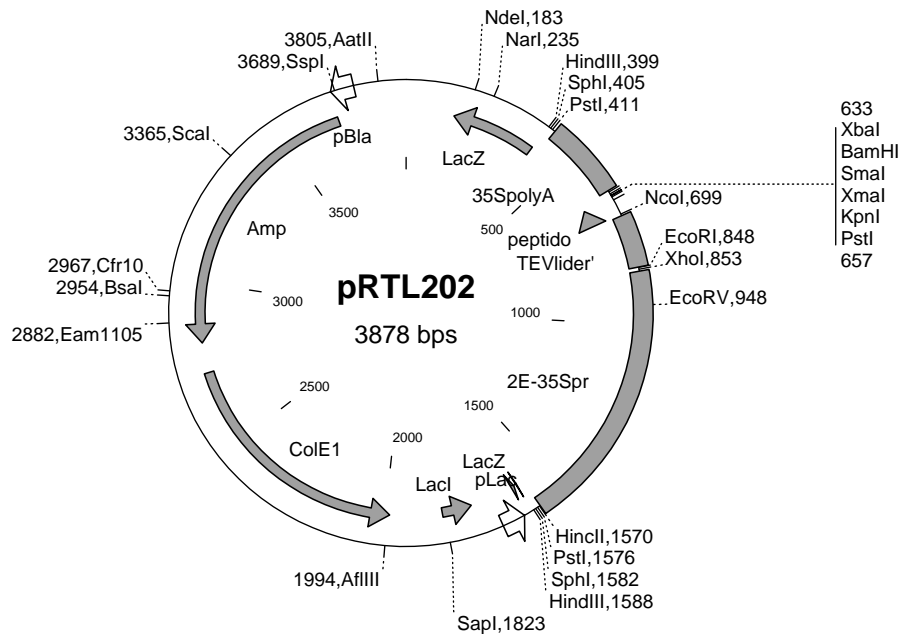


Figura 1: vector pRTL202 (Carrington *et al.*, 1991)

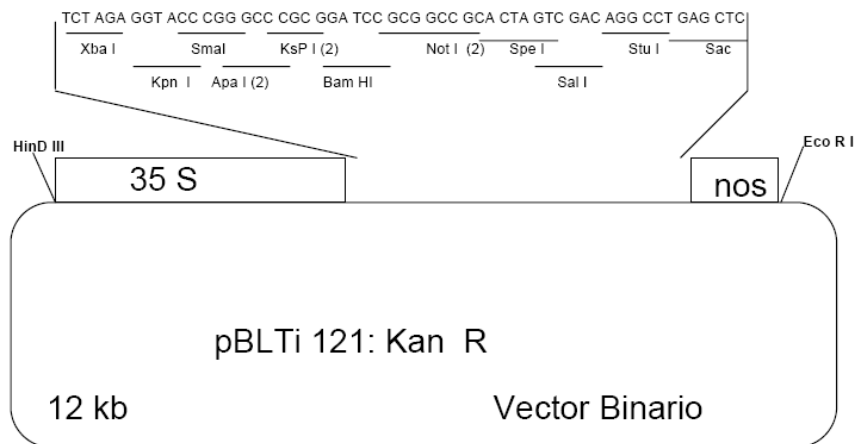


Figura 2: vector binario pBLTi 121 (Gomord *et al.*, 1996)

1.6 Primers utilizados

Los *primers* utilizados (Tabla 1) son específicos para amplificar el gen smRS-GFP con fusión a las señales de amaranto, en rojo se marcan los sitios de restricción incorporados, en negritas la región complementaria al extremo 5' de GFP y, en formato itálico y negritas las secuencias incorporadas para las señales KISIA (AmhCt) y NIFRGF (AmhH1N). El producto de amplificación es de aproximadamente 600bp.

Tabla 1: Primers utilizados para amplificar GFP.

Primer's	Tipo	Secuencia	Temperatura
5'pRTGFP	Foward	5'-GGTGGGTACCGGTAGCACCAATGAGTAAAGGAGAAGAAC-3'	55°C
3'AmhCt	Reverso	5'-CGGGTCTAGATCAAGCAATAGAAATCTTGAAGATCCCGTCGACTT TGTA-3'	55°C
3'AmhH1N	Reverso	5'-CGGGTCTAGATCAGAATCCACGAAAAATGTTGAGGATCCCGTCGACTTTGTA-3'	55°C

1.7 Proteínas fluorescentes utilizadas

La proteína verde fluorescente utilizada smRS-GFP (*soluble membrana red shifted GFP*) fue aislada por PCR desde el plásmido pCD3-327 (Davis *and* Vierstra, 1998). La misma presenta un rango de excitación a 470-490nm (máx. a 488nm), con un pico máximo de emisión detectado con filtro 505-550nm.

La proteína roja fluorescente, mCherry- γ -TIP (Nebenfuhr *et al.*, 2007). Presenta un rango de excitación 530-560nm (máx. a 545nm), con un pico máximo de emisión detectado con filtro 590-620nm.

2. Metodologías

2.1 Minipreparación de DNA plasmídico

La purificación de DNA plasmídico se realiza mediante el método de lisis alcalina (Birnboim *and* Doly, 1979), con modificaciones. Una alícuota de 1.5 ml de cultivo bacteriano crecido ON en agitación, se centrifuga a 14000 rpm durante 1 minuto (este procedimiento se puede repetir hasta tres veces). El precipitado obtenido se resuspende en 300 μ l de Solución I (25 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM glucosa; 10 mM EDTA) con lisozima a una concentración final de 0,5mg/ml. Seguido, se agregan 300 μ l de Solución II (0,2 N NaOH; 1 % v/v SDS) y se incuba en agua-hielo durante 5 minutos. Luego se neutraliza con 300 μ l de Solución III (3M acetato, 5M potasio pH 4.8) y se incuba en agua-hielo durante 5 minutos. Se realiza una centrifugación a 14000 rpm por 15 minutos. Al sobrenadante obtenido se le agrega RNAsa A, a una concentración final de 20 μ g/ml, incubando luego a 37°C por 10 minutos. Posteriormente se realizan dos extracciones con 1 volumen de cloroformo para eliminar proteínas y se precipita el DNA plasmídico presente en la fase acuosa por el agregado de 0,7 volúmenes de isopropanol. Se centrifuga por 10 minutos a 14000 rpm. El

precipitado obtenido se lava con etanol 70 % y por último se resuspende en 20 µl de agua bidestilada estéril.

2.2 Digestión con enzimas de restricción

Para las digestiones con enzimas de restricción se utilizaron: 500 ng de DNA purificado, 5 U de enzima, *buffer* de restricción apropiado en un volumen final de 30 µl. Las reacciones se incubaron 2 horas a la temperatura recomendada para cada enzima.

2.3 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

El procedimiento utilizado es el que se detalla en el protocolo de QIAquick gel Extraction (QIAGEN). El taco de gel que contiene el DNA a recuperar se disuelve con 3 volúmenes de Buffer QG, calentando a 55 °C por 5 minutos. A la agarosa disuelta se la coloca en la columna de absorción, colocada en el tubo colector y, se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos. Se deja que la solución conteniendo el DNA pase por la columna impulsada por la fuerza de gravedad o bien se centrifuga 1 minuto a 2000 rpm. El DNA es retenido en la columna. La solución que pasó al tubo colector se descarta. La columna se lava con 0,750 ml de Buffer New Wash incubándose por 5 minutos a temperatura ambiente. Seguido se centrifuga primero a 2000 rpm por 30 segundos, se descarta nuevamente el líquido del tubo colector y, se vuelve a centrifugar a 12000 rpm por 1 minuto. Se coloca la columna con un tubo de 1,5 ml y se agrega a la misma 20 µl de Buffer EB o agua bidestilada estéril. Se incuba a 55°C por 5 minutos y por último se centrifuga a 12000 rpm por 1 minuto. La fracción eluída contiene el DNA de interés.

2.4 Subclonado de las construcciones doble reportero al vector binario

Para la transformación estable o transitoria de plantas, con las construcciones GFP-GUS-señal, estas se subclonaron desde el vector simple pRTL202 al vector binario pBLTi 121 según la Figura 3.

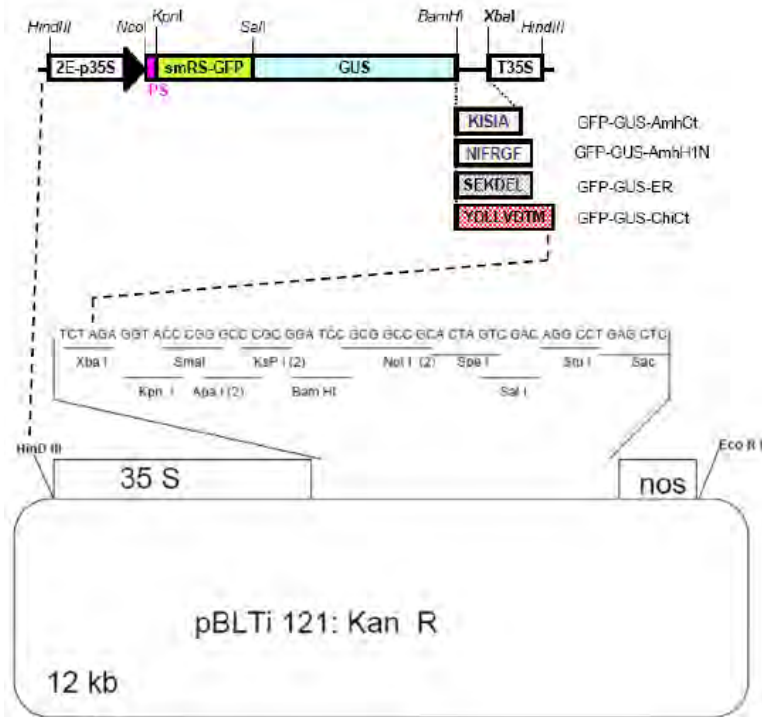


Figura 3: Representación esquemática del subclonaje de los constructos GFP-GUS-señal de direccionamiento de amaranto, desde pRTL202 al vector binario pBLTi 121. En la gráfica se indican los sitios de restricción utilizados y el lugar de inserción en el vector binario (flechas discontinuas).

2.5 Extracción de DNA de tejido vegetal para PCR

Para obtener el DNA genómico se homogeneizaron 10 discos de hojas (aprox. 0.5cm de diámetro) en un tubo de 1,5ml, con un vástago de punta cónica y se agregaron 700 μ l de *buffer* de extracción de ácidos nucleicos (Tris-HCl 500 mM pH8, EDTA 10 mM pH8, NaCl 100 mM, 2-Mercaptoetanol 10 mM, SDS 1 %, (Dellaporta *et al.*, 1983). Se agitó enérgicamente y se incubó a 65 °C durante 10 min. Se agregaron 200 μ l KAc 5 M, se mezcló por inversión y se incubó en hielo 20 min. Luego se centrifugó en microcentrífuga a 14000 rpm durante 20 min a 4 °C. Al sobrenadante se le agregó 1 Vol. de isopropanol y a la mezcla se la incubó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a temperatura ambiente y se lavó 2 veces el precipitado con etanol 70 %. El DNA obtenido fue resuspendido en 50 μ l de agua con 2 μ l de RNAsa 10 mg/ml.

2.6 Extracción de proteínas totales desde hojas

Para obtener las proteínas totales de hojas se molieron en N₂ líquido con mortero 10 discos de hojas (aproximadamente de 0.5cm² c/u) y se agregó 1ml de *Buffer* de extracción frío (20mM Tris pH=8,5; 20mM bisulfito de sodio; 5mM ácido etilendiamintetracético (EDTA) pH=8.0; 0.2mM PMSF). Los extractos se incubaron por 30 minutos en agua-hielo y luego se centrifugaron a 14000 rpm por 20 minutos. Los sobrenadantes se trasvasaron a tubos nuevos (considerados como extracto total de proteínas) y se almacenaron a -20°C.

2.7 Extracción y purificación de anticuerpos de plantas

Para extraer los anticuerpos desde hojas o semillas (estas últimas deshidratadas previamente con éter etílico y desgrasadas con hexano), se molieron 30 g de material con N₂ líquido y se extrajo con 30ml de *Buffer* de extracción: 20mM Tris pH=8,5; 20mM bisulfito de sodio; 5mM ácido etilendiamintetracético (EDTA) pH=8.0; 0.5mM PMSF y 1,6%p/v polivinilpolipirrolidona (PVPP), incubando por 30 minutos a 4°C. La mezcla se filtró luego con una lámina de Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA) y el filtrado se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Con el sobrenadante se realizó una precipitación seriada con sulfato de amonio saturado (20% y 60%), incubado por 5 minutos a 4°C y centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C para la primera y, posteriormente incubado durante 20 minutos a 4°C y centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C para la segunda. El precipitado resultante se resuspendió en *buffer* de unión: 20 mM Tris, 0.5M cloruro de sodio pH=8.5. Luego se clarificó centrifugando a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C y, por último se filtró el sobrenadante a través de un filtro de tamaño de poro 4µm. El filtrado se purificó con una columna de agarosa anti-ratón γIgG (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). La columna se lavó con 5 volúmenes de *buffer* de unión para eliminar la proteína no unida, luego la proteína unida fue eluída con *buffer* de elución: 0.2M glicina, 0,15M cloruro de sodio pH=2.4 y neutralizada en el tubo de recolección, con 1M Tris pH=8,5. La proteína eluída por último se dializó y liofilizó.

2.8 Reacción de PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en ciclador Gene Amp PCR System 2400 o (PERKIN ELMER) o MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, California, EEUU). Para realizar la reacción de PCR se utilizó una pre-mix con la siguiente composición:

Pre-mix estandar	Conc. Final	Para 1 tubo Vf=15µl
Buffer Taq DNApol (10X)	1X	1,5 µl
Cl ₂ Mg (25mM)	1.5 mM	0,9 µl
dNTPs (10mM c/u)	0.2 mM	0,3 µl
Primer forward (10 uM)	1.0 µM	1,5 µl
Primer reverse (10 uM)	1.0 µM	1,5 µl
Taq DNApol (5 U/ul)	0.01 U/µl	0,04 µl
H ₂ O bidestilada para PCR		7,26 µl
Total pre-mix		13,0 µl
Muestra de DNA		2,0 µl
TOTAL PCR		15,0 µl

Perfil de ciclado estándar

94°C	5 minutos	} 35 ciclos
94°C	30 segundos	
T _{ann} °C	45 segundos	
72°C	60 segundos	
72°C	5 minutos	

La temperatura de hibridación (T_{ann}, *T. annealing*) es la correspondiente a los primers utilizados (Tabla 1). El tiempo de elongación a 72°C, es ajustado según la velocidad de amplificación de la polimerasa utilizada (1kb/min). Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8-1.0 %–TAE 1X en presencia de bromuro de etidio.

2.9 Electroforesis

2.9.1 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

El análisis electroforético de las muestras proteicas se efectuó utilizando el equipo Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la preparación del gel de poliacrilamida se siguió el protocolo descrito por Laemmli (1970), con modificaciones como se describen en Mini-protean II Electrophoresis Cell Manual (BioRad).

2.9.2 Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa 0.8% con bromuro de etidio

Los productos de ácidos nucleicos se analizaron en geles de agarosa al 0,8% en buffer TAE 0,5X. Los geles contenían una solución de bromuro de etidio (5×10^{-4} mg/ml). Los geles fueron digitalizados con la cámara Cámara Kodak Z 712 IS (7.1 Megapixels) con un Filtro Naranja para Bromuro de Etidio. Todos los geles se prepararon en cubas de electroforesis de 7 x 10 cm; 15 x 10 cm o 25 x 15 cm. Las corridas electroforéticas de realizaron a 80-90V. .

2.10 Tinción con el colorante azul de *Coomassie*

Los geles de poliacrilamida se tiñeron con una solución de azul de Coomassie 0,05 % (*Coomassie Brilliant Blue R 250* 0,05 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %) por 1 ó 2 h con agitación suave. Se retiró la solución de tinción y se decoloró, el exceso de colorante, mediante incubación en solución de lavado (metanol 50 %, ácido acético 10 %). El gel se decoloró realizando varios cambios de la solución de lavado, hasta que las bandas proteicas se visualizaron con nitidez.

2.11 Western blot

2.11.1 Electrotransferencia

Luego de efectuada la electroforesis, los geles de poliacrilamida fueron equilibrados por 20 min en *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, metanol 20 %) junto con la membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell Bioscience, Keene, NH). Se montó el *cassette* del equipo electrotransferencia MiniProtean II (Biorad) colocando el gel y la membrana de nitrocelulosa entre papeles de filtro. Seguido se colocó el *cassette* dentro de la cuba, se llenó con *buffer* de transferencia y, por último se aplicó una corriente constante de 250 mA, voltaje máximo, por 1 hora o, a voltaje constante de 22 volts por 2 horas, siempre a 4°C.

2.11.2 Tinción reversible con colorante Rojo Ponceau (RP, Sigma-Aldrich)

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

2.11.3 Detección inmunológica y afinodetección de las proteínas

Luego de la tinción con el colorante RP, las membranas se incubaron 1 hora a 37°C en solución de bloqueo 3% leche en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, leche descremada Molico). Luego del bloqueo, se lavaron con la solución de lavado TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM) y se incubaron con anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado a peroxidasa (HRP, *horseradish peroxidase*) (1 µg/mL en 1% leche en TBS), anticuerpo monoclonal específico de la secuencia KDEL (Stressgen Bioreagents, San Diego, CA) o, anticuerpos de conejo específicos de β 1,2-Xilosa (β 1,2-Xyl), , α 1,3-Fucosa (α 1,3-Fuc) y Lewis A (Le^a) (1 µg/mL en 1% gelatina en TBS) (Faye *et al.*, 1993; Fitchette-Lainé *et al.*, 1997). Seguido, se lavaron las membranas 3 veces, por 15 minutos cada vez, con solución de lavado TBS. Las membranas tratadas con anticuerpos específicos de glicanos, se incubaron entonces con una dilución 1:1000 a 1:3000 del anticuerpo conjugado (anti-conejo conjugados con HRP, SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO). Luego de 1 hora de incubación a 37°, se descartó la dilución del segundo anticuerpo y se lavaron las membranas 3 veces con solución de lavado TBS por 15 minutos cada vez. La señal inmunoreactiva fue detectada por 4-cloro-1-naftol o luminol (Sigma-Aldrich), seguida de exposición sobre un film rayos-X (Kodak, New Haven, NH).

Los glicanos ricos en manosa fueron analizados por afinodetección utilizando el método de concanavalina A-peroxidasa (Faye *and* Chrispeels, 1985).

2.12 ELISA Sándwich

Para cuantificar el nivel de acumulación del anticuerpo 14D9 y sus distintas variantes (sec-Ab, Ab-KDEL, Ab- γ KDEL y Ab- κ KDEL) se utilizó el método de ELISA sándwich. Placas de ELISA de 96 wells (Maxisorp, Nunc, Denmark), se cargaron con una solución 1µg/ml anticuerpo de cabra específico de las cadenas κ o γ de inmunoglobulinas de ratón, en *buffer* fosfato salino (PBS) a 4°C *overnight*. Se bloquearon los sitios de unión no específicos con solución de bloqueo (3% leche descremada en PBS) por 1 hora a 37°C. Seguido se realizaron tres lavados con PBS y, se incubaron con extracto total de proteínas de hojas a 4°C *overnight*. Las placas se lavaron nuevamente tres veces con PBS y, posteriormente se incubaron por 1 hora a 37°C con anticuerpo de cabra específico de las cadenas κ o γ de inmunoglobulinas de ratón, conjugado con HRP a una concentración final de 1µg/ml en 1% leche descremada

en PBS. Las placas se lavaron por 5 veces con PBS, y por último se incubaron con el sustrato específico de peroxidasa, tetrametilbenzidina (TMB, Kirkegaard *and* Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Luego se midió la densidad óptica a 650nm. Las curvas de calibración se realizaron con una inmunoglobulina de ratón purificada comercial (Sigma-Aldrich) como patrón estándar.

2.13 Reacción histoquímica para GUS

El tejido vegetal donde se determina la actividad de la enzima β -glucuronidasa (expresión del gen uidA, GUS) se incubó overnight a 37°C en *buffer* GUS (buffer fosfato de sodio 0,1M a pH=7,0; 8 mM ferrocianuro de potasio; 8mM ferricianuro de potasio; 0.5 mg/ml de X-Glu (ácido 5-Bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucurónico) y 0,2% de Tritón X100). Posteriormente se realizaron lavados con 100 mM Tris-ClH pH=7 y el tejido se decoloró por extracción de la clorofila con una serie creciente de soluciones conteniendo etanol: 30 % v/v, 50 % v/v, 70 % v/v, 90 % v/v y 100 % v/v. Se rehidrató el tejido invirtiendo los lavados de la serie de etanol, manteniendo la muestra en 100 mM Tris-ClH pH=7.

2.14 Obtención de cepas *Agrobacterium tumefaciens* recombinantes

2.14.1 Obtención de *Agrobacterium tumefaciens* electrocompetentes

La obtención de *Agrobacterium* electrocompetentes se realizó de la siguiente manera: se inoculó 1 ml de agrobacterias provenientes de un cultivo saturado en 100 ml de medio YEB y se dejó crecer hasta una densidad óptica (DO) de 600 nm igual a 0,5-0,7. Las bacterias se centrifugaron a 4000 rpm (rotor JA-14 Beckman®) por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en glicerol 10 % estéril y frío en 4 sucesivos lavados de 1; 0,5; 0,2 y 0,2 Vol., del cultivo original. Finalmente, las bacterias fueron resuspendidas en 0,01 Vol. y se alicuotaron. Por último fueron conservadas a -70 °C hasta su uso.

2.14.2 Transformación por electroporación de cepas *Agrobacterium tumefaciens*

En todos los casos las bacterias fueron transformadas por electroporación. Brevemente, se mezclaron 50 μ l de bacterias competentes con 50 ng de vector de transferencia. La mezcla se colocó en una cubeta de electroporación (electrodo de 0,2

cm, BioRad) y se sometieron a 2,5 volts, 25 μ FD de capacitancia y 400 Ω de resistencia en un electroporador (BioRad Gene PulserTM). Inmediatamente se agregó medio YEB y las bacterias se recuperaron a 28 °C durante 3 h en agitación (200 rpm). Luego se plaquearon en medio YEB sólido en presencia de 50 μ g/ml de streptomycin y 50 μ g/ml de kanamicina para las cepas LBA 4404 o, 50 μ g/ml de gentamicina y 50 μ g/ml de kanamicina para la cepa GV3101. Las colonias fueron crecidas en medio líquido con los mismos antibióticos durante 48 horas a 28 °C en agitación. Los clones positivos se conservaron en medio YEB con antibióticos y 15 % de glicerol a -70 °C hasta su uso.

2.15 Agroinfiltración de hojas de *N. tabacum* (expresión transitoria)

Los ensayos de agroinfiltración se efectuaron de acuerdo al método de Llave *et al.* (2000). Para ello se cultivó un clon de *A. tumefaciens*, conteniendo el plásmido binario correspondiente, en medio YEB con los antibióticos adecuados a 28 °C por 24 horas. Se diluyó el cultivo en medio de infiltración (MI): 10 mM MgCl₂, 10 mM ácido morfolinoetansulfónico (MES) pH 5.7) con el agregado de 200 mM acetosiringona, a una DO 600nm de entre 0,2 y 1,0 dependiendo del experimento. Se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se infiltró la superficie abaxial de las hojas de *N. tabacum* utilizando una jeringa de 1 ml sin aguja. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 horas de luz, a 22-24 °C para los tiempos ensayados.

2.16 Transformación de discos de hojas de tabaco mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (expresión estable)

Para la transformación estable de *Nicotiana tabacum* se cultivaron previamente las cepa de *A. tumefaciens* LBA4404, conteniendo las construcciones de interés, en medio YEB sólido con los antibióticos estreptomycin y kanamicina durante 48 horas. a 28°C. Seguido, se transfirió una ansada del cultivo sólido fresco a 20ml de medio líquido con los mismos antibióticos, y se cultivaron las bacterias con agitación a 28° C, toda la noche. Posteriormente, se realizó la medición de absorbancia a 600nm hasta que el cultivo llegase a fase exponencial de crecimiento (A_{600} entre 0.5 y 1.0).

Paralelamente se cortaron hojas de *N. tabacum* bien expandidas (plantas aproximadamente de 4 a 6 semanas de desarrollo) y esterilizadas por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% y SDS 0.1 % por 20 min. Por último, se lavaron con abundante agua bidestilada estéril. Luego, se realizaron los cortes quitando la nervadura central y los bordes de las hojas y obteniendo cuadrados de entre 0.5 y 1 cm² (aproximadamente 80 cortes por construcción). Se dejaron en placas húmedas mientras se preparó la dilución del cultivo de *A. tumefaciens*. Para ello, se centrifugaron 5 ml del cultivo, a 5000 rpm por 5 min, y se resuspendieron en 5 ml de medio de inoculación y co-cultivo.

Seguidamente, se prepararon las placas con medio de co-cultivo (aproximadamente 20ml por placa) y se inocularon con 400µl de *A. tumefaciens* por placa. Los explantos (aproximadamente 20 por placa) se colocaron en contacto con el medio de co-cultivo inoculado y se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente. Se pasaron a un papel de filtro estéril para secar el exceso de inóculo y por último se pasaron a medio de inoculación y cocultivo sólido (Tabla 2) por 48 horas a 23°C en oscuridad. Luego del período de cocultivo, se pasaron los explantos a medio de regeneración y selección sólido (Tabla 2) conteniendo 100mg/l de kanamicina y 500mg/l de carbenicilina y se incuban con un fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad a 25±2°C por aproximadamente 2 semanas, hasta la aparición de callos. Los discos se transfieren con la cara abaxial hacia el agar (unos 15 explantos por caja). Luego de 1 o 2 semanas, los discos expandidos se cortaron en cuatro partes iguales y se separan los pequeños callos formados transfiriéndolos a medio de regeneración fresco. En caso de contaminaciones, se transfirieron los discos no contaminados a medio fresco.

Los vástagos generados con varias hojas no cotiledóneas y unos 5 mm o más de longitud desde la base de los callos se cortaron y se pasaron a medio de enraizamiento (Tabla 2) con 500mg/l de carbenicilina y 100mg/l de kanamicina como agente selector.

Para la rustificación, se retiraron delicadamente las plántulas enraizadas de 5 a 8 cm de altura, y se cultivaron en macetas insufladas de 0.25 litros, conteniendo suelos estériles con una composición 3:1:1 de tierra: vermiculita: perlita. Las plántulas se aclimataron en invernadero, cubiertas con una bolsa de plástico, para mantener la

humedad relativa alta, por una semana. Tras ese período, se abrieron las bolsas de plástico y se retiraron luego de 2 a 3 semanas. Luego de 4 o 6 semanas de rustificación, se tomaron hojas para hacer los análisis moleculares. Ante la aparición de florescencias, las mismas se cubrieron con bolsas de papel para facilitar la autopolinización y evitar la polinización cruzada. Luego de 4 semanas, las semillas maduras se cosecharon y una porción de las mismas se cultivaron, previa esterilización, en medio de germinación (Tabla 2) conteniendo 100mg/l de kanamicina como agente selector.

Tabla 2: Composición de los distintos medios utilizados en la transformación de discos de hojas de tabaco. Para los medios sólidos se utilizó 7gr/l de Agar tipo A (Sigma-Aldrich). Para la hormona BAP (Bencilamino purina) se utilizó un stock 1000X=1mg/ml, para NAA (ácido naftalenacético) un stock 1000X=0,1mg/ml. Las vitaminas Gamborg (Sigma-Aldrich) se prepararon a una concentración final de 1000X. MS, sales macro y micronutrientes de Murashigine and Skoog

Medios	Inoculación y Cocultivo	Regeneración y Selección	Enraizamiento	Germinación
MS	4,3gr/l	4,3gr/l	4,3gr/l	2,15gr/l
Vitaminas Gamborg	1,0ml/l	1,0ml/l	1,0ml/l	1,0ml/l
Sacarosa	30gr/l	30gr/l	30gr/l	30gr/l
BAP	1mg/l	1mg/l	X	X
NAA	0,1mg/l	0,1mg/l	0,1mg/l	X
pH	5,7-5,8	5,7-5,8	5,7-5,8	5,7-5,8

2.17 Transformación transitoria de protoplastos T87 de Arabidopsis

La obtención de protoplastos se realizó esencialmente como describe Axelos *et al.*, (1992) desde un cultivo en suspensión de células de *Arabidopsis thaliana*. Los protoplastos se transformaron con PEG utilizando 10µg de cada plásmido y 10µg de DNA esperma de salmón sonicado (Abael *et al.*, 1998). Los protoplastos transformados se incubaron a 23°C en oscuridad y, fueron observados por microscopía de fluorescencia a diferentes tiempos postransfección.

2.18 Tinción con rojo neutro (RN)

Todas las observaciones se realizaron en raíces intactas y vivas de 4 semanas de cultivo. El colorante rojo neutro se preparó como una solución stock de 4mM en H₂O, la concentración final que se utilizó es de 1µM en *buffer* fosfato de potasio 0,1mM y

pH=8,0. El material vegetal es directamente sumergido en la solución final de rojo neutro, por 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de colorante se lavó con *buffer* fosfato de potasio 0,1mM pH=8,0 con agitación casual por 60min.

2.19 Microscopías

2.19.1 Microscopía confocal de escaneo láser en protoplastos T87 de *Arabidopsis t.*

Los protoplastos se observaron con microscopía confocal de escaneo-láser (LSM510, Carl Zeiss Inc.). GFP es excitada a 488nm con láser de Argón y, la emisión se monitoreó utilizando el de filtro 505-550nm. Las imágenes se adaptaron mediante el software Adobe Photoshop CS2, 2009 (Adobe Systems Inc., Mountainview, CA).

2.19.2 Microscopía confocal de escaneo láser en plantas de *Nicotiana tabacum*

La expresión transitoria en hojas de tabaco se observó por microscopía confocal de escaneo láser (Leica SP5, Leica Microsystems Heidelberg GMBH). GFP se excitó a 488nm con láser de Argón (30%) y, la emisión se monitoreó con filtro espectral de 510-538nm.

La expresión en hojas de plantas transgénicas Nt-GFP-GUS-AmhCt y Nt-GFP-GUS-AmhH1N se visualizó con microscopía confocal de escaneo láser (Nikon CI, Nikon Instruments Inc., Melville, NY). GFP es excitada a 488nm con láser de Argón (25%) y, la emisión se monitoreó utilizando el de filtro 505-550nm. Para el ensayo de co-infiltración con el fluoróforo rojo, mCherry- γ -TIP (Nebenfuhr *et al.*, 2007) en plantas transgénicas, se observó la expresión con microscopio de fluorescencia (Olympus BX61, Olympus Corporation, Tokio-Japan). GFP es excitada a 450-490nm y, la emisión se monitoreó utilizando el de filtro 505-550nm. La proteína roja (mCherry- γ -TIP) es excitada a 530-560nm y la emisión se observó con filtro dicróico a 590-620nm.

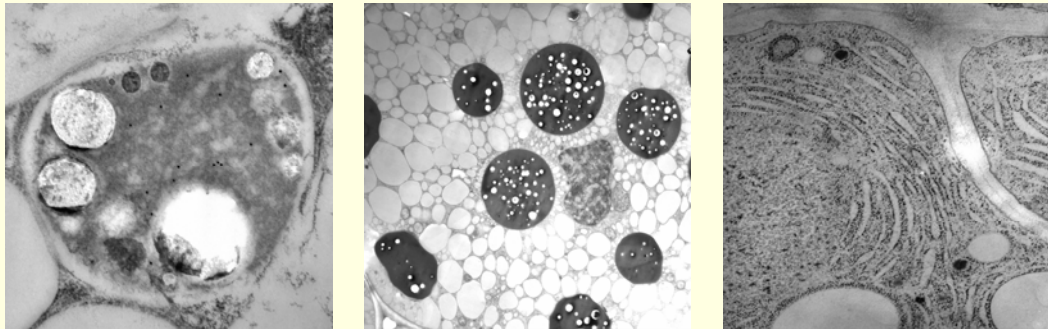
Los cortes de semillas y raíces se observaron mediante microscopía de disección fluorescente (Leica DMI6000B, Leica Microsystems CMS, GMBH). GFP es excitada a 450-490nm y, la emisión se monitoreó utilizando el de filtro 500-550nm (*GFPplant*, Leica Microsystems CMS, GMBH). El fluoróforo rojo neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina, Sigma-Aldrich) es excitado a 530-560nm y la emisión se observó con filtro 590-620nm (*DsRed*, Leica Microsystems CMS, GMBH)

2.19.3 Inmunomicroscopía

Para la observación mediante inmunomicroscopía, las muestras de semillas y hojas se procesaron esencialmente como se describe en Otegui *et al.* (2002) con algunas modificaciones (Petruccelli *et al.*, 2006). Los cortes obtenidos se observaron por microscopía electrónica (Zeiss *EM 109*, Zeiss, Thornwood, NY).

CAPITULO I

“EXPRESION DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL FUSIONADO A LA SECUENCIA KDEL EN PLANTAS DE *Nicotiana tabacum*”



- Estudiar el direccionamiento de un anticuerpo catalítico con y sin fusión a la señal KDEL en distintos órganos.
- Analizar si existen diferencias en las modificaciones post-traduccionales de este anticuerpo fusionado a dos señales de direccionamiento, cuando se expresa en semilla.

CAPITULO I

“EXPRESION DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL FUSIONADO A LA SECUENCIA KDEL EN PLANTAS DE *Nicotiana tabacum*”

I.1 Introducción

Muchas especies de plantas han sido exitosamente utilizadas para producir anticuerpos monoclonales biológicamente activos, como se mencionó anteriormente. En tabaco, alfalfa y otras especies la expresión se suele realizar principalmente en hojas, mientras que en papa, maíz, colza, soja, cárcamo, trigo o arroz se prefiere el tubérculo o semilla. Las estrategias de producción en plantas presentan muchas ventajas en contraste con otros sistemas aunque, también tienen desventajas, como los ya mencionados escasos rendimientos y las modificaciones postraduccionales realizadas, que afectan la cantidad y calidad del producto recombinante expresado.

En la introducción general **sección 1.3** se detalló distintas estrategias utilizadas para incrementar los niveles de acumulación de proteínas recombinantes en plantas. Como se mencionó, los anticuerpos monoclonales contienen uniones disulfuro y deben glicosilarse de una manera muy específica ya que la estructura de los glicanos incorporados afecta su vida media en sangre y, su habilidad para reclutar las moléculas y/o células del sistema inmunológico (Jefferis *et al.*, 2005). Asimismo, la adición de residuos de β 1,2-xilosa y α 1,3-fucosa, que ocurre en el aparato de Golgi *trans* de células vegetales, genera estructuras que no es habitual en anticuerpos y que han sido informado como antigénicas y alérgicas (Gomord *et al.*, 2005; Bardor *et al.*, 2003).

Por este motivo, con el fin de incrementar los niveles de acumulación y además evitar el agregado de glicanos complejos propio de células vegetales, se ha utilizado señales de retención en el retículo endoplásmico, como HDEL/KDEL (Chrispeels *and* Faye, 1996; Lerouge *et al.*, 1998; Faye *et al.*, 2005) para producir inmunoglobulinas recombinantes en plantas. Si bien anticuerpos completos fusionados a la secuencia

KDEL en el extremo COOH de la proteína, han sido expresados en plantas transgénicas de tabaco, ya sea con la secuencia de retención fusionada a ambas cadenas polipeptídicas (Sriraman *et al.*, 2004; Triguero *et al.*, 2005) o, solamente fusionada a la cadena pesada (Ko *et al.*, 2003), éstos han mostrado diferencias en su glicosilación. Por otro lado, en estos estudios sólo se han limitado a analizar las inmunoglobulinas recuperadas de hojas de tabaco y no de otros órganos y las construcciones empleadas no han permitido evaluar el efecto de la secuencia de retención/recuperación en los niveles de acumulación. En relación con la glicosilación, el análisis de los oligosacáridos liberados desde estos anticuerpos purificados de hoja, mostró que solamente el anticuerpo específico de la gonadotropina coriónica (hCG) con doble señal KDEL (Sriraman *et al.*, 2004) es completamente retenido en ER o recuperado desde el *cis*-Golgi; mientras que la inmunoglobulina específica del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) fusionada a dos secuencias KDEL (Triguero *et al.*, 2005) y la específica del virus de la rabia humano fusionado sólo a una secuencia de retención en la cadena pesada (Ko *et al.*, 2003) exhiben un 10%-20% de glicanos complejos manifestando que la molécula ha alcanzado el aparato de Golgi *trans*.

Asimismo, a pesar de que se ha mostrado que la secuencia HDEL/KDEL actuaría como de retención en el ER o de recuperación del aparato Golgi en hojas de tabaco, en semillas en germinación de *Vigna mungo*, se ha descrito la presencia de proteasas vacuolares del tipo papaína (SH-EP) que contienen en su región C-terminal una secuencia KDEL que sería importante para su inclusión en vesículas que se liberan del ER (denominadas vesículas KDEL) y que las transportan a vacuolas (Okamoto *et al.*, 2003). Esto muestra que es necesario realizar estudios que permitan evaluar el posible efecto de la señal KDEL, no solo en la acumulación de proteínas recombinantes sino además, en el direccionamiento, estabilidad y modificaciones postraduccionales que tienen las mismas en los distintos órganos de la planta.

Por lo antedicho, uno de los objetivos de este trabajo es estudiar el posible incremento en los niveles de acumulación de un anticuerpo completo en plantas a través de su direccionamiento a vacuolas de reserva utilizando la secuencia KDEL, ya que se ha postulado que en semillas podría direccionar a este órgano y, además estudiar las modificaciones postraduccionales que sufre al tomar esta vía de transporte en los distintos órganos de la planta.

I.2 Resultados

I.2.1. Efecto de la secuencia KDEL sobre la acumulación del anticuerpo 14D9 purificado desde hojas de *Nicotiana tabacum*

Al comienzo de este trabajo, nuestro laboratorio contaba con plantas transgénicas de tabaco que expresaban dos versiones del anticuerpo catalítico 14D9: secretoria (sec-Ab) o fusionada a la secuencia de retención en el Retículo Endoplásmico KDEL en ambas cadenas polipeptídicas (Ab-KDEL), bajo la dirección de dos promotores: uno constitutivo (2E-CaMV 35S) y otro específico de semilla (subunidad α'

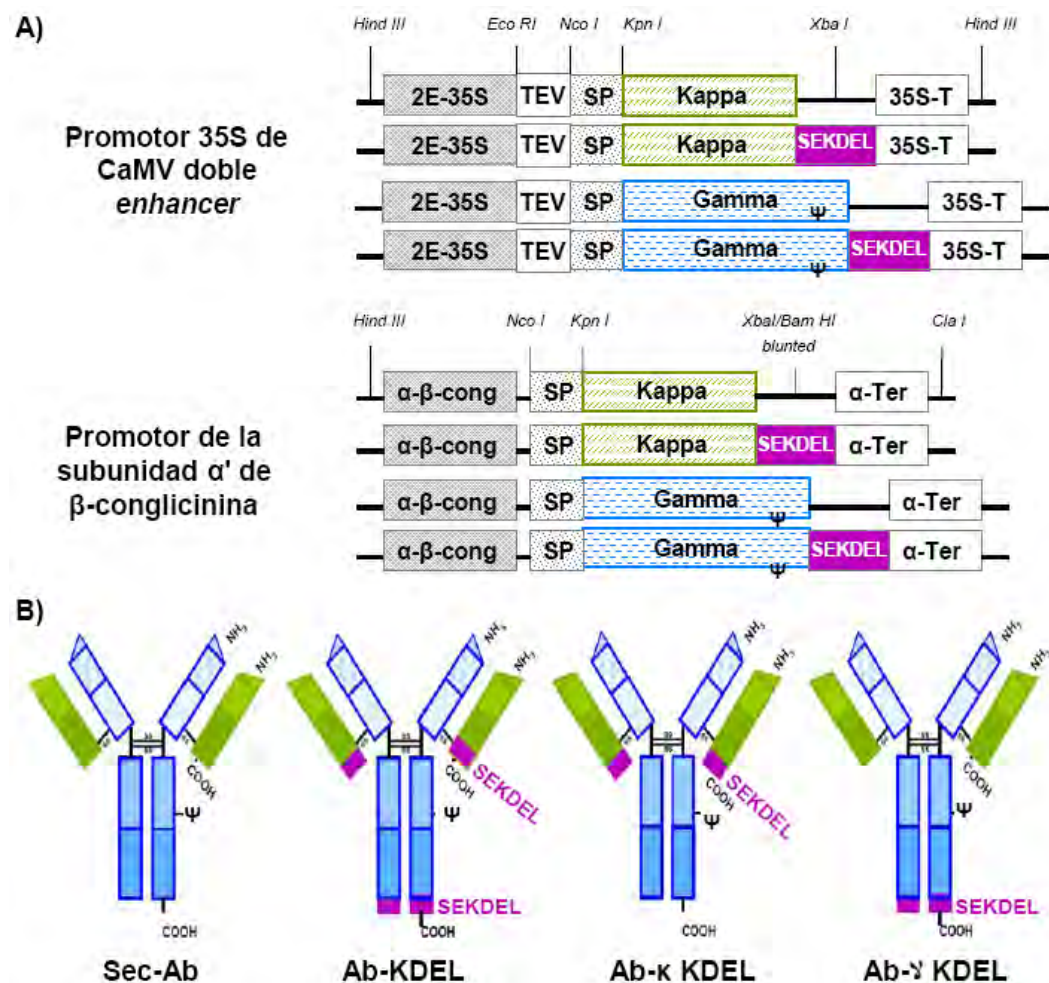


Figura 1: Representaciones esquemática. **A)** Construcciones utilizadas en el capítulo. Expresión constitutiva con el promotor 35S de CaMV doble enhancer (2E-35S) o específico de semilla con el promotor de la subunidad α' de β -conglucina (α' - β -cong); (TEV) Secuencia *leader* de TEV; (Ψ) sitio de glicosilación; (SP) péptido señal de la cadena pesada de una inmunoglobulina secretoria de ratón; señales de terminación: de α' - β -conglucina (α -Ter) o de 35S CaMV (35S-T). **B)** Estructura de los anticuerpos 14D9 expresados en tabaco y analizados: Secretorio (sec-Ab), de Retención/Recuperación con la secuencia COOH-terminal [SE] KDEL en ambas cadenas (Ab-KDEL), exclusivamente en la cadena kappa (Ab- κ KDEL) o exclusivamente en la cadena gamma (Ab- γ KDEL).

de la β -conglucina de soja). Para facilitar la exposición de la secuencia KDEL, se adicionaron dos aminoácidos [SE] entre el extremo codificante de la inmunoglobulina y la señal de retención. Con el fin de evaluar entonces, si el número de secuencias KDEL fusionados al anticuerpo afecta la eficiencia de retención recuperación de las distintas versiones de la inmunoglobulina, y calcular asimismo un incremento en los niveles de acumulación, se generaron además por fertilización cruzada plantas que expresaban el anticuerpo completo fusionado a esta señal exclusivamente en una de sus cadenas polipeptídicas, en la cadena gamma (Ab- γ KDEL) o en la cadena kappa exclusivamente (Ab- κ KDEL). Las construcciones y estructuras mencionadas se esquematizan en la Figura 1.

Todas las líneas independientes que expresaban las distintas versiones de la inmunoglobulina (con señal en las ambas cadenas, solo en una de ellas o sin la señal KDEL), fueron utilizadas como material de partida para purificar los anticuerpos de hojas. La molienda se realizó empleando nitrógeno líquido, extrayéndose posteriormente el anticuerpo con buffer bisulfito 20mM, seguido de una etapa de concentración por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Posteriormente se recurrió a una cromatografía de afinidad y aunque inicialmente se emplearon columnas de agarosa conteniendo proteína A , G y A/G ajustando las condiciones para las inmunoglobulinas de tipo gamma 1 de ratón, no se logró purificar el anticuerpo, por eso finalmente se recurrió a cromatografía empleando anticuerpos específicos contra inmunoglobulinas G de ratón inmovilizados en agarosa.

El número de líneas independientes de plantas F1 que expresaban Ab- γ KDEL y Ab- κ KDEL obtenidas luego de los cruces, fue muy reducido (dos líneas independientes para Ab- γ KDEL y tres para la última) lo que imposibilitó realizar un análisis comparativo, en cuanto a los niveles de acumulación de las distintas versiones del anticuerpo, siendo que para sec-Ab y Ab-KDEL se obtuvieron 25 líneas independientes de cada una y seleccionadas además la mejor productora luego de sucesivas generaciones para ser analizada. Por otro lado, el grado de pureza e integridad obtenido con los anticuerpos con una única señal KDEL no fue el adecuado para determinar la composición de glicanos, por lo que tampoco se pudo establecer si la retención/recuperación es igualmente eficiente con una o dos señales KDEL fusionadas.

Teniendo en cuenta entonces estos resultados y, que el objetivo de este trabajo es estudiar el posible incremento en el nivel de acumulación del anticuerpo en plantas a través de su direccionamiento a vacuolas de reserva y poder determinar las modificaciones postraduccionales y localización subcelular tanto en hojas como en semillas al utilizar la señal KDEL, se decidió avanzar únicamente con el estudio de los anticuerpos que presentan la secuencia KDEL en ambas cadenas (Ab-KDEL) así como también con el secretorio (sec-Ab).

Con cada uno de los anticuerpos purificados sec-Ab o Ab-KDEL, se evaluó los niveles de acumulación por ELISA sándwich. En estudios previos, se observó que el empleo de la secuencia KDEL fusionado en ambas cadenas, producía un leve incremento (2-4 veces) en los niveles de acumulación en hojas, mientras que en semillas el efecto era más importante (10 veces) al utilizar simultáneamente tanto la señal de retención en el ER como el promotor específico de semilla (Petruccelli *et al.*, 2006). Al analizar los niveles de acumulación en hojas, el valor obtenido para sec-Ab (1.5 ± 0.2 $\mu\text{g/ml}$) fue muy inferior al compararlo con el planticuerpo con la señal de retención fusionada a ambas cadenas Ab-KDEL (12.7 ± 4.1 $\mu\text{g/ml}$). El incremento observado en hojas en el nivel de acumulación fue entonces de entre 5 y 8 veces al utilizar la señal KDEL, siendo superior al obtenido en los estudios previos (2-4 veces). Si se tiene en cuenta que para los ensayos realizados aquí se utilizaron las líneas de plantas mejores productoras, seleccionadas luego de varias rondas de generación, a diferencia de los estudios previos donde solo se utilizaron para la purificación las plantas F1 de las líneas mejores productoras, la diferencia mencionada podría deberse entonces a la baja tasa de segregación de las cadenas individuales del anticuerpo en semillas lo que determinaría un incremento en la estabilidad de cada proteína en sucesivas generaciones.

Con estos datos, solamente podemos confirmar los resultados obtenidos previamente, donde se pudo observar un aumento en la acumulación del anticuerpo expresado en hojas al utilizar la secuencia KDEL en ambas cadenas polipeptídicas con respecto al anticuerpo secretorio, y que este incremento puede ser levemente mayor luego de varias rondas generacionales.

I.2.2 Análisis de la integridad y pureza de los anticuerpos purificados desde hojas y semillas de *N. tabacum*

Antes de evaluar las modificaciones postraduccionales y localización subcelular de las distintas formas del anticuerpo, se estudió la integridad y pureza de los mismos. Como se mencionó anteriormente, solamente se utilizó el anticuerpo catalítico 14D9 con señal de retención en ER tanto en la cadena kappa como en gamma (Ab-KDEL) y sin la señal (sec-Ab), purificados desde plantas transgénicas con expresión constitutiva por el promotor 35S de CaMV o de expresión específica en semilla con el promotor de la subunidad α' de la β -conglucina de soja (Figura 1). Adicionalmente, para la purificación de las inmunoglobulinas desde semillas, las mismas fueron desgrasadas previamente a la molienda y extracción, con hexano. La pureza de los anticuerpos obtenidos se evaluó por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y por Western blot en condiciones no reductoras y reductoras (Figura 2).

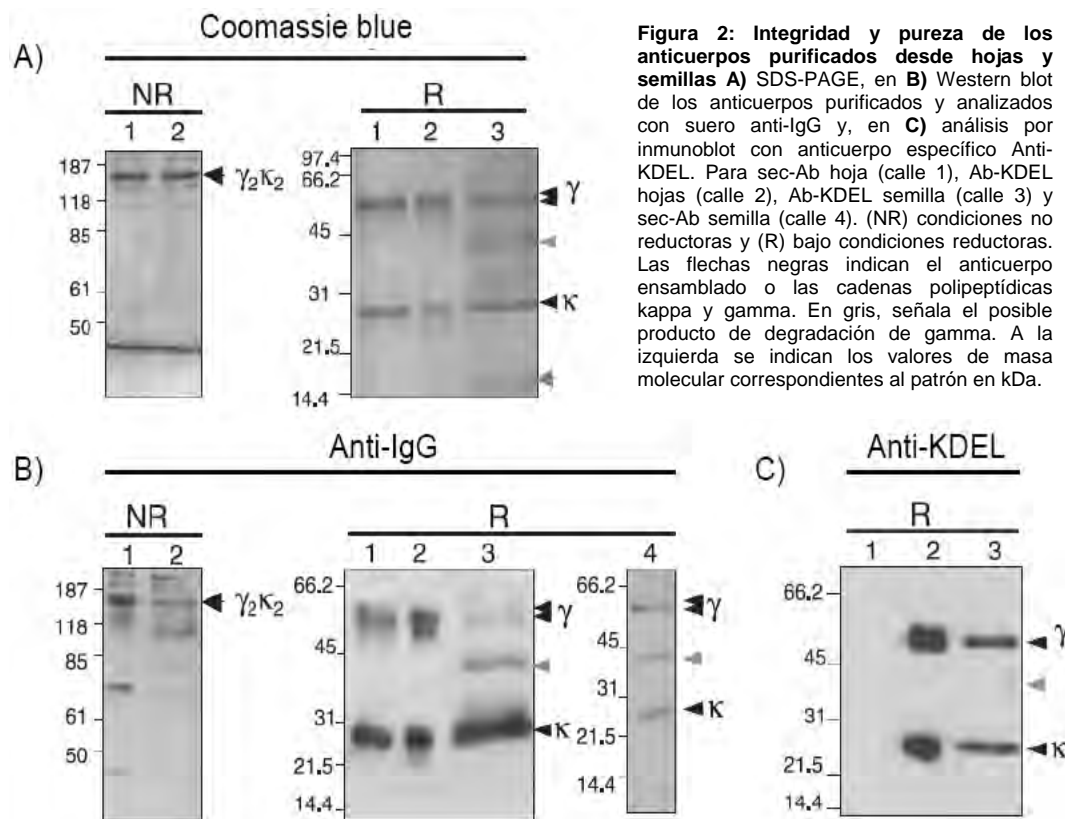


Figura 2: Integridad y pureza de los anticuerpos purificados desde hojas y semillas A) SDS-PAGE, en B) Western blot de los anticuerpos purificados y analizados con suero anti-IgG y, en C) análisis por inmunoblot con anticuerpo específico Anti-KDEL. Para sec-Ab hoja (calle 1), Ab-KDEL hojas (calle 2), Ab-KDEL semilla (calle 3) y sec-Ab semilla (calle 4). (NR) condiciones no reductoras y (R) bajo condiciones reductoras. Las flechas negras indican el anticuerpo ensamblado o las cadenas polipeptídicas kappa y gamma. En gris, señala el posible producto de degradación de gamma. A la izquierda se indican los valores de masa molecular correspondientes al patrón en kDa.

Bajo condiciones no reductoras, tanto sec-Ab y Ab-KDEL purificados de extractos de hoja (sec-Ab_{hoja} y Ab-KDEL_{hoja}, respectivamente) tenían una masa

molecular de 180 kDa, correspondiente con la estructura habitual de una inmunoglobulina ($\gamma_2\kappa_2$). Si bien el tamaño molecular es algo mayor a lo predicho en base a las secuencias polipeptídicas probablemente se deba al resultado de la glicosilación de la cadena gamma (Figura 2B, flecha negra). En la Figura 2B se observan otras bandas de menor intensidad y que son reconocidas por un suero específico contra inmunoglobulinas de ratón, y que podrían representar otros estados de agregación de las cadenas pesadas y livianas que ya aparecen en la planta o bien se forman durante la purificación, a pesar de haber utilizado bisulfito de sodio 20 mM para evitar la oxidación de grupos sulfhidrilos libres durante la purificación (Bakker *et al.*, 2001). Al analizar los Ab-KDEL_{hoja} en condiciones reductoras, se observa que tanto la cadena pesada como la liviana presentan una doble banda (Figura 2, flechas negras) que no se observa en sec-Ab_{hoja} ni en Ab-KDEL_{semilla}. Aunque el doblete observado para las cadenas livianas y pesadas de Ab-KDEL_{hoja} podría atribuirse a una remoción parcial de la secuencia KDEL como ha sido informado para otras señales de direccionamiento que son removidas una vez que la proteína alcanza el destino final ((Neuhaus *and* Rogers, 1998), el Western Blot realizado empleando un anticuerpo monoclonal específico contra la secuencia KDEL (Figura 2C) muestra que estos dobletes son reconocidos por este anticuerpos, por lo que la hipótesis de remoción de esta secuencia en las cadenas livianas y pesadas de Ab-KDEL_{hoja} se descarta.

Por otro lado, Ab-KDEL_{semilla} y sec-Ab_{semilla} además de las bandas correspondientes a las cadenas livianas y pesadas, exhibió en condiciones reductoras, una banda tenue intermedia (Figura 2A y B, flecha gris) aparentemente como producto de degradación de la cadena gamma con o sin KDEL, no así para los polipéptidos purificados desde hoja. Esta banda no es reconocida por el anticuerpo específico de la secuencia KDEL.

Los resultados anteriores nos permiten concluir que los anticuerpos se ensamblan de manera correcta, tanto en hojas como en semillas de tabaco y que se obtuvieron niveles de pureza suficientes para estudios posteriores de glicosilación ya que todas aquellas bandas observadas por tinción para proteínas son también reveladas con un anticuerpo específico de inmunoglobulinas de ratón. Por otro lado, se pudo observar que en semilla la cadena gamma sufre degradación proteolítica específica y que no se debe a degradación durante la purificación.

1.2.3 Estudio del grado de glicosilación del anticuerpo 14D9 producido en plantas con ambas señales de direccionamiento

La glicosilación de los polipéptidos purificados a partir de extractos de hojas y de semillas, fue estudiada por afinodetección empleando concanavalina A (con A) para detectar glicanos ricos en manosa y por Western blot (inmunoblot) con sueros específicos de glicanos complejos de plantas: β 1,2-Xilosa (β 1,2-Xyl), α 1,3-Fucosa (α 1,3-Fuc) y Lewis^a (Le^a). Como se observa en la Figura 3, los anticuerpos recombinantes purificados sec-Ab_{hoja}, Ab-KDEL_{hoja} y Ab-KDEL_{semilla}, poseen N-glicanos ricos en manosa en la cadena gamma, ya que es detectado por la afinidad a concanavalina A, no así para la cadena liviana (Figura 3, Con A). Por la presencia de α -1,3-fucosa, β -1,2-xilosa y epitopes de Lewis^a (estos últimos típicos de proteínas extracelulares, Fitchette-Laine *et al.*, 1997) en sec-Ab_{hoja}, se puede deducir que este anticuerpo ha pasado por el *trans*-Golgi y alcanzaría el espacio extracelular (Figura 3, calle 1). En contraste, Ab-KDEL_{hoja} no es reconocido por estos sueros indicando que no ha alcanzado el *trans*-Golgi, lo que sugiere una eficiente retención en el retículo endoplásmico o bien una recuperación desde el aparato de Golgi *cis* (Figura 3, calle 2). Con los anticuerpos purificados desde semillas (Ab-KDEL_{semilla} y sec-Ab_{semilla}), se puede observar la presencia de glicanos complejos en la cadena gamma, en particular se advierte que el fragmento entero es reconocido principalmente con anti- β 1,2-Xyl y anti-Lewis^a, en cambio el producto de degradación es mayoritariamente con anti- α -1,3-fucosa (Figura 3, calle 3 y 4). Esto indica que ambos anticuerpos alcanzan el *trans*-Golgi independientemente de la presencia de la secuencia KDEL.

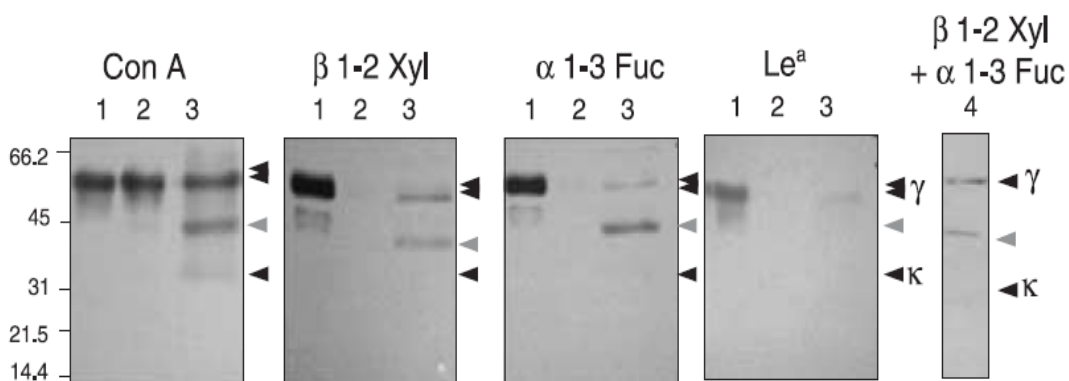


Figura 3: Análisis del grado de glicosilación mediante inmunoblot, con Concanavalia A (Con A); β 1,2-Xilosa (β 1,2-Xyl); α 1,3-Fucosa (α 1,3-Fuc) y Lewis^a (Le^a). Para Ab-sec hoja (calle 1), Ab-KDEL hojas (calle 2), Ab-KDEL semilla (calle 3) y Ab-sec semilla (calle 4). Las flechas negras indican las cadenas kappa y gamma y en gris, señala el posible producto de degradación de gamma. A la izquierda se indican las masas moleculares del patrón en kDa.

Con el objetivo de caracterizar de manera más precisa el tipo de glicanos presentes en los planticuerpos, se partió de aproximadamente 1mg de anticuerpo purificado y los glicanos fueron liberados por sucesivos tratamientos con pepsina y N-glicosidasa A (PNGase A) de almendra; posteriormente los glicanos se marcaron fluorescentemente con 2-aminobenzamida y se separaron por *Matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS). En el caso de los anticuerpos purificados de semilla no fue posible obtener muestras en cantidad y grado de pureza requerida para este análisis. Los resultados obtenidos para sec-Ab_{hoja} y Ab-KDEL_{hoja} se muestran en la Figura 4.

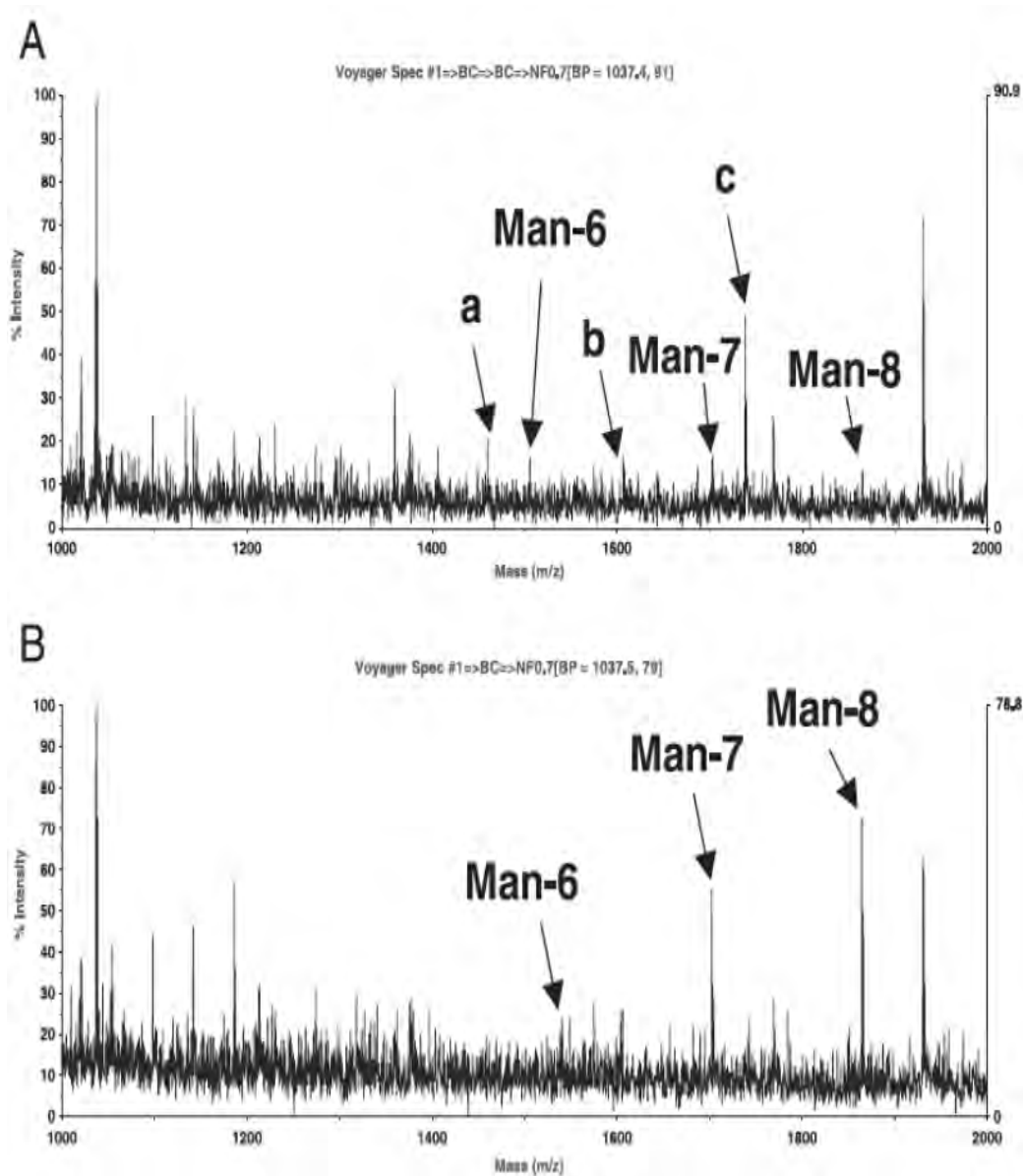


Figura 4: Análisis de glicanos aislados por MALDI-TOF-MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry*): desde sec-Ab (A) y Ab-KDEL (B) ambos purificados de hoja. Para los picos señalados como a) corresponde: GN₂-Man₂-GN₂. b) GN₂-Man₂-Fuc-GN₂. v c) GN₂-Man₂-Xil-Fuc-GN₂.

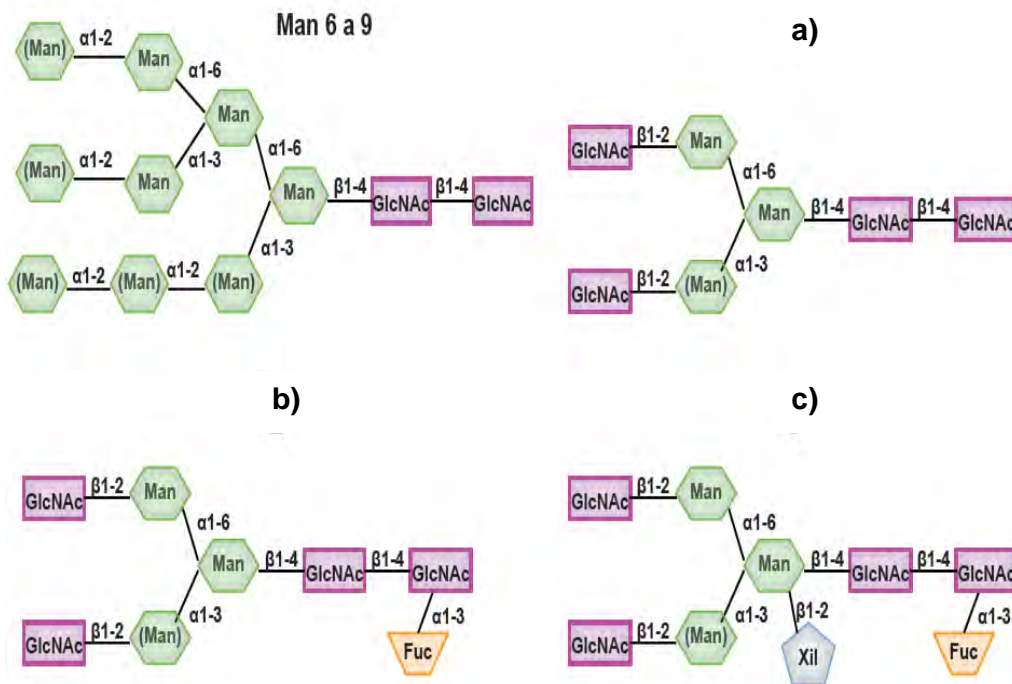


Figura 5: Representación esquemática de glicanos presentes en el anticuerpo 14D9 secretorio (sec-Ab_{hoja}) o con la señal de retención/recuperación en ER, expresado en hojas de tabaco. Las estructuras Man 6-9; a); b) y c) representan los picos señalados en MALDI-TOF-MS de la Figura 4.

sec-Ab_{hoja}, mostró predominantemente N-glicanos con picos de masa característicos a Man₆ (1539.4637m/z), Man₇ (1702.3257m/z) y Man₈ (1864.6240 m/z) (Figura 4A), así como también picos de GN₂-Man₃-GN₂ (1459.4722m/z), GN₂-Man₃-Fuc-GN₂ (1606.5270m/z), y GN₂-Man₃-Xil-Fuc-GN₂ (1731.5303m/z) (Figura 4A: a, b y c respectivamente). Por otro lado, Ab-KDEL_{hoja} solo presentó picos de masa en (1539.8330m/z, 1701.8937m/z y 1865.0188m/z) correspondientes a Man₆, Man₇ y Man₈ respectivamente (Figura 4B), además en la misma puede apreciarse similares proporciones relativas para las estructuras Man₇ y Man₈, siendo algo menor para la forma Man₆. Las posibles estructuras de los glicanos correspondientes a cada uno de los picos mayoritarios obtenidos desde las dos versiones del anticuerpo purificado de hojas, se esquematizan en la Figura 5.

Estos datos demuestran que en hojas Ab-KDEL es estrictamente retenido en ER ya que presenta mayoritariamente la forma de Man₈, o correctamente recuperado desde el *cis*-Golgi por la presencia de Man₆ y Man₇; mientras que el mismo anticuerpo sin señal sería parcialmente secretado ya que sufre modificaciones de enzimas ubicadas normalmente en el *trans*-Golgi y, por el contenido de glicanos típicos de proteínas extracelulares como Lewis^a (Fitchette-Laine *et al.*, 1997).

I.2.4 Localización subcelular de los anticuerpos por inmunomicroscopía electrónica

La localización subcelular de los anticuerpos recombinantes en hojas y semillas fue inicialmente estudiada empleando los métodos tradicionales de fijación química empleando distintas concentraciones de paraformaldehído-glutaraldehído, seguida de inclusión en el LR white (London Resin) sin embargo con este tipo de metodología no se logró detectar de forma específica el plantículo en los cortes de tejido. Es por ello que finalmente se recurrió al empleo de congelamiento a altas presiones (*High-pressure freezing*) seguido de criosustitución a fin de lograr una óptima preservación de la estructura y epítopos. Estos estudios fueron realizados en la Universidad de Wisconsin, Madison, USA, como se detalla en Materiales y Métodos. Las micrografías obtenidas al revelar las secciones de hojas y/o semillas que expresaban altos niveles de anticuerpos sec-Ab o Ab-KDEL con anticuerpos de cabra específico para kappa o gamma de ratón y uno secundario anti-cabra conjugado con partículas de oro de 15nm, se muestran en la Figura 6. En células del mesófilo de hojas que acumulaban Ab-KDEL las partículas de oro se encontraron solamente en ER (Figura 6A y B, flechas negras). Este resultado está de acuerdo con la ausencia de glicanos complejos en Ab-KDEL_{hoja} (Figura 3, calle 2). En cambio al analizar Ab-KDEL en secciones de cotiledones maduros, se observó que las partículas de oro se encontraban tanto en la matriz de PSV como en el espacio intercelular (Figura 6, E y F).

De manera similar, el anticuerpo sec-Ab de semillas se encontró inexplicablemente solo en la matriz de PSV (Figura 6, C y D). Este resultado llama mucho la atención ya que se ha postulado que el camino *default* es la secreción, es decir que proteínas que sólo poseen como determinante de direccionamiento un péptido señal deben ser secretadas (Vitale *et al.*, 1999).

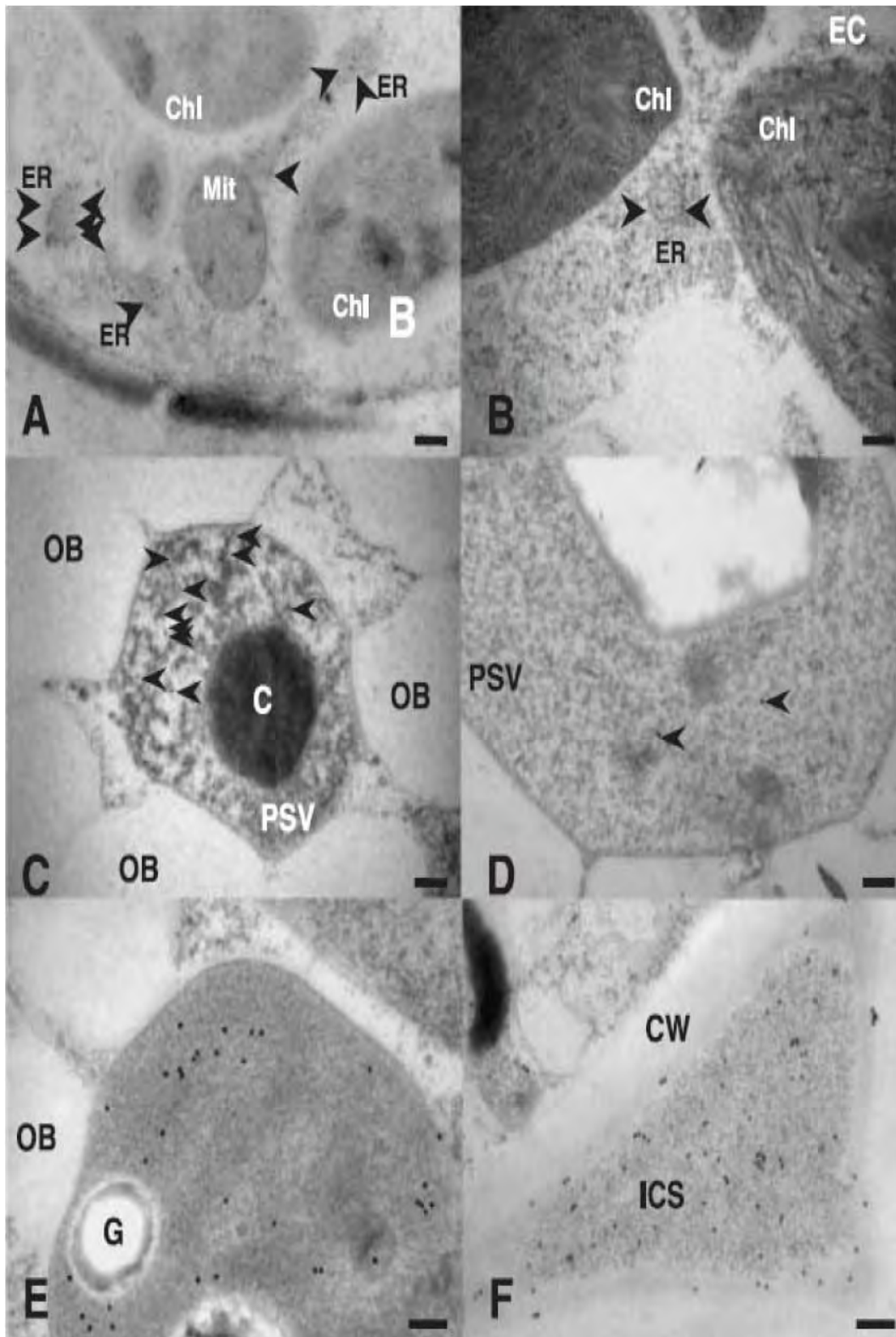


Figura 6: Micrografía electrónica de transmisión: con anticuerpo γ específico marcado con oro en células de parénquima de hojas expresando Ab-KDEL (A,B) y cotiledones maduros expresando sec-Ab (C,D) o Ab-KDEL (E;F). En las mismas **c** indica Cristaloides, **Chl** cloroplasto, **ER** retículo endoplásmico, **G** globoide, **ICS** espacio intercelular, **Mit** mitocondria, **OB** cuerpos lipídicos y **PSV** vacuolas de almacenamiento de proteínas. La escala corresponde a 200nm.

I.3 Discusión

Teniendo en cuenta los resultados de este capítulo, podemos decir que sec-Ab_{hoja} se expresa de manera estable y, es correctamente secretado por una vía Golgi-dependiente, ya que el anticuerpo purificado presentó N-glicanos complejos α -1,3-fucosa, β -1,2-xilosa y en menor proporción epitopes de *Lewis*^a, típicos de proteínas extracelulares.

Los estudios realizados por inmunocropía electrónica de hojas expresando Ab-KDEL_{hoja} mostraron que se localiza en ER. Los datos de MALDI-TOF-MS muestran en éste la presencia de glicanos ricos en manosa con igual composición en Man₇ /Man₈ y menor para Man₆. Si se tiene en cuenta que las enzimas que degradan el glicano hasta alcanzar la forma de Man₈ se encuentran estrictamente en ER, mientras que la conversión de Man₈ a Man₇ es llevada a cabo por la acción parcial de la α -manosidasa-I que ocurre en el *cis*-Golgi, se puede concluir que una proporción de Ab-KDEL_{hoja} es estrictamente retenido en el ER (la que lleva Man₈) mientras que la que poseen Man₆ y Man₇ es recuperada desde el *cis*-Golgi por unión al receptor ERD2-KDEL siguiendo el transporte retrogrado hasta el ER. La ausencia de glicanos más complejos indica que el mecanismo de recuperación en células vegetales, funciona sólo con moléculas que no hayan avanzado más allá del aparato de Golgi *cis*, a diferencia de lo que ocurre en células de levaduras y animales que se pueden recuperan proteínas desde el *trans*-Golgi. La presencia de glicanos Man₇ y Man₈ en proporciones similares y ausencia de glicanos complejos también ha sido informada por Sriraman *et al.* (2004) para la expresión del anticuerpo específico de Gonadotropina Coriónica humana (hCG) en tabaco, el cual presentaba la fusión de la secuencia KDEL con una extensa secuencia de unión (*linker*), de 15 aminoácidos [VDGGGGGSAAARGSE], al carboxilo terminal de ambas cadenas de la inmunoglobulina. En el caso de la expresión en tabaco de las inmunoglobulinas específicas para el Antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B humana (HBsAg), también con KDEL en ambas cadenas, con un *linker* de dos aminoácidos [SR](Triguero *et al.*, 2005) y, para el virus de la Rabia humana pero con la secuencia KDEL fusionada al COOH terminal de la cadena gamma exclusivamente, con un *linker* de 6 histidinas [HHHHHH] (Ko *et al.*, 2003), se obtuvieron mayoritariamente glicanos de Man₇ y una baja proporción de N-glicanos complejos, indicando por un lado una mayor recuperación desde el *cis* Golgi (y menor retención) que en el caso anterior y, por otro la

probable secreción de una proporción reducida de Ig-KDEL que correspondería con la fracción con glicanos complejos. En estos trabajos no se estudió la localización celular ni tampoco se analizó la presencia de glicanos de tipo de Lewis^a para confirmar la secreción. Estas diferencias observadas, también podrían estar relacionada a propiedades intrínsecas de los distintos anticuerpos; no obstante, los resultados obtenidos por Fischer *et al.* (1999) con la expresión del fragmento simple cadena biespecífico (bi-scFv), con la secuencia KDEL y el mismo *linker* que 14D9 [SE], fue igualmente eficiente en la retención/recuperación, demostrando principalmente la importancia que representa la composición y longitud de la secuencia del *linker* utilizada, la cual favorece la exposición de la señal de retención/recuperación para ser reconocida por el receptor-KDEL, por sobre el número de secuencias KDEL presentes (Sriraman *et al.*, 2004). En la Figura 7, se esquematiza comparativamente los distintos anticuerpos (o bi-scFv, en último caso) y los diferentes *linker*'s utilizados en relación a los estados de glicosilación y localización subcelular. En nuestro caso, podríamos decir entonces que el *linker* [SE] utilizado aquí asegura que el C-terminal KDEL quede eficazmente accesible permitiendo una unión segura con su receptor, garantizando la completa retención/recuperación de la inmunoglobulina en ER.

En semillas la secuencia C-terminal KDEL muestra un comportamiento dual ya que Ab-KDEL_{semilla} es almacenado en PSV y parcialmente secretado, además por la presencia de N-glicanos complejos se pudo determinar que el mismo es transportado por una vía Golgi dependiente. El almacenamiento de proteínas recombinantes con la señal KDEL en compartimientos de almacenamiento en semillas ha sido reportado previamente; por ejemplo el grupo de Torres *et al.* (2001) encontró que fragmentos simple cadena (scFv-T84.66-KDEL) fueron localizados en Cueros Proteicos tipo I y II derivados del ER en endosperma de arroz. Asimismo, en semillas de tabaco la expresión de fitohemaglutinana y faseolina con dicha secuencia (Herman *et al.*, 1990; Pueyo *et al.*, 1995) fueron encontradas en PSV y dirigida por una vía Golgi dependiente, aunque en estos casos no se observó secreción. La secreción de Ab-KDEL_{semilla} podría deberse posiblemente al direccionamiento mediado por KDEL y a una saturación parcial de la maquinaria de transporte (Crofts *et al.*, 1999), lo que determina importantes diferencias en la retención y el direccionamiento vacuolar entre hojas y semillas.











Molécula	Linker	Glicosilación	Localización	Referencia
 Ab-KDEL hoja	[SE]	 Man ₇ = Man ₈	Retención /Recuperación en Reticulo Endoplásmico	
 Anti-hCG-KDEL hoja	[VDGGGGG SAAARGSE]	 Man ₇ = Man ₈	Retención /Recuperación en Reticulo Endoplásmico	Sriraman y col., 2004
 Anti-HBsAg-KDEL hoja	[SR]	 80% Man ₇ y complejos	80% en Reticulo Endoplásmico y 10-20% alcanza <i>Trans</i> Golgi	Triguero y col., 2005
 Anti Rabia- γ KDEL hoja	[HHHHHH]	 80% Man ₇ y complejos	80% en Reticulo Endoplásmico y 10-20% alcanza <i>Trans</i> Golgi	Ko y col., 2003
 Bi-scFv2429-KDEL hoja	[SE]	No reportado	Retención /Recuperación en Reticulo Endoplásmico	Fischer y col., 1999
				

Figura 7: comparación de diferentes números de secuencias KDEL presentes y la secuencia *linker* utilizada en relación a la composición de glicanos encontrada y la localización subcelular de distintos anticuerpos (o diabody) expresados en hojas de tabaco.

Por otro lado, *sec-Ab_{semilla}* sorprendentemente es transportado y localizado en la matriz de PSV también por una vía Golgi-dependiente, lo que pudo observarse en cortes de inmunomicroscopía electrónica y además, por presentar reactividad frente a suero de N-glicanos complejos (α -1,3-fucosa y β -1,2-xilosa). Similares resultados han sido reportados en la expresión de la glicoproteína B de Citomegalovirus humano en semillas de tabaco (Wright *et al.*, 2001). Esta impredecible localización de proteínas secretorias en compartimientos de reserva, era atribuida como una característica especial en endosperma de cereal (Arcalis *et al.*, 2004). Asimismo, estudios previos han

mostrado con distintas proteínas recombinantes que existe una especialización funcional en células de planta, particularmente con tejidos de reservas, dando como resultando una desviación a la esperada vía por “default” (Wright *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003; Nicholson *et al.*, 2005; Drakakaki *et al.*, 2006; van Droogenbroek *et al.*, 2007). Esto supondría entonces la existencia de un direccionamiento de proteínas tejido-específico, especialmente en semillas. Sin embargo, la expresión de una fitasa recombinante secretoria en *Medicago truncatula*, utilizada como modelo de leguminosa, en quien los cotiledones están especializados en almacenamiento de proteínas, fue perfectamente capaz de secretar la fitasa recombinante (Abranches *et al.*, 2008), mostrando que dicha especialización del direccionamiento de proteínas en tejidos de reserva es un fenómeno especie-dependiente.

Como se mencionó anteriormente al menos tres rutas diferentes han sido reconocidas en el transporte de proteínas de almacenamiento desde el ER a PSV en plantas: la vía Golgi-dependiente (por medio de DV); el transporte directo ER-PSV (mediante vesículas PAC) y la ruta autofágica (Otegui *et al.*, 2006). Si bien otros grupos han reportado el transporte a PSV de distintas proteínas recombinantes con el motivo HDEL/KDEL, son dirigidas por una vía Golgi independiente (mediante PBs y/o o vesículas KDEL) (Toyooka *et al.*, 2000; Frigerio *et al.*, 2001 y Tamura *et al.*, 2004), los resultados expuestos aquí avalan el direccionamiento vacuolar en semillas de tabaco por una vía Golgi dependiente. Esto sugiere además, que la eficiencia del direccionamiento mediado por KDEL, en tabaco es órgano dependiente, siendo Ab-KDEL correctamente retenido en hojas, pero dirigido a vacuolas o parcialmente secretado en semillas. Similares diferencias órgano dependiente, fueron observadas en el direccionamiento de distintas glicoproteínas modelos estudiadas en arroz (*Oryza sativa*), en donde dichas proteínas se encontraron en cuerpos de prolamina derivados del ER y PSV dentro del endosperma (van Droogenbroeck *et al.*, 2007; Takaiwa *et al.*, 2009). En contraste, Abranches *et al.* (2008) observan que el direccionamiento de SP-phy fusionada al C-terminal KDEL en *M. truncatula*, también es predominantemente retenida en ER y, parcialmente secretada o almacenada en PSV, aunque de manera similar tanto en hojas como en semillas, por lo que el direccionamiento en distintos órgano de la planta también es especie dependiente.

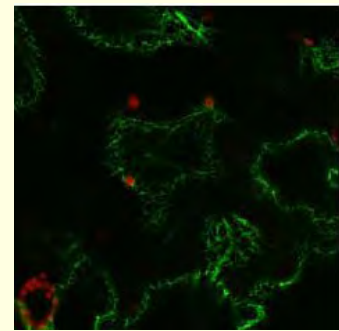
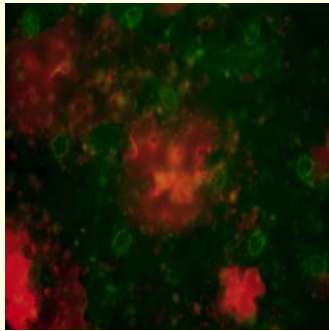
Otra diferencia importante pudo observarse al comparar la expresión en hojas y en semillas, es el procesamiento proteolítico ya que los perfiles proteicos obtenidos en las secciones anteriores para los anticuerpos purificados desde semillas, mostraron que existía algún tipo de degradación proteolítica, aparentemente correspondiente a la región N-terminal de la cadena gamma, que no es observado en los anticuerpos purificados desde hojas. En este sentido, los fragmentos de la cadena gamma de Ab-KDEL_{semilla} y de sec-Ab_{semilla} observados, podrían explicarse como el producto del clivaje proteolítico por Enzimas de Procesamiento Vacuolar (VPE: *vacuolar processing enzymes*), que reconoce un sitio específico dentro de la cadena polipeptídica. Estas enzimas pertenecen a la familia de endopeptidasas conocidas como legumainas (Kembhavi *et al.*, 1993), que durante el desarrollo de la semilla, hidrolizan la unión peptídica Asn-Gly (NG) de la región hipervariable de la subunidad IV de las proteínas de almacenamiento 11S. Estos resultados muestran entonces que en PSV existen proteasas que reconocen específicamente cierta secuencia del anticuerpo 14D9 clivándolo y, para poder expresar este en forma estable en semillas es necesario identificar y modificar este sitio de clivaje.

I.4 Conclusiones

- ✦ La fusión de la secuencia KDEL C-terminal en las cadenas kappa y gamma produce un aumento en su nivel de acumulación.
- ✦ Las distintas formas del anticuerpo monoclonal 14D9 se ensamblan de manera correcta tanto en hojas como en semillas.
- ✦ Los mismos se expresan de manera estable en hojas, no así en semilla sufriendo degradación proteolítica.
- ✦ El *linker* [SE] entre el C-terminal de la inmunoglobulina y la secuencia KDEL sería eficiente para la exposición de la señal.
- ✦ Ab-KDEL en hojas es retenido correctamente en ER, mientras que el mismo anticuerpo sin señal KDEL es secretado.
- ✦ En semillas de tabaco la secuencia C-terminal KDEL muestra un comportamiento dual: almacenamiento en PSV y secreción parcial.
- ✦ En las mismas, la expresión del anticuerpo sin la señal produce su acumulación en PSV.
- ✦ El direccionamiento a PSV en semillas de tabaco es a través de una vía Golgi-dependiente.

CAPITULO II

“EXPRESIÓN DE FUSIONES GFP-GUS A SEÑALES PUTATIVAS DE DIRECCIONAMIENTO VACUOLAR DERIVADAS DE UNA GLOBULINA DE RESERVA”



- Evaluar la eficiencia de las señales KISIA o GNIFRGF, derivadas de la globulina 11S de amaranto, para dirigir las proteínas reporteras GFP-GUS a vacuolas de reserva en plantas como otra alternativa de señal de direccionamiento.

CAPITULO II

“EXPRESIÓN DE FUSIONES GFP-GUS A SEÑALES PUTATIVAS DE DIRECCIONAMIENTO VACUOLAR DERIVADAS DE UNA GLOBULINA DE RESERVA”

II.1 Introducción

La utilización de plantas como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes, como se detalló anteriormente, ofrece potencialmente numerosas ventajas en comparación con otros sistemas. Su rentabilidad económica depende esencialmente de la obtención de un producto de calidad y un alto rendimiento; por ello, numerosos esfuerzos se han llevado a cabo en el transcurso de los años para mejorar tanto los procesos *upstream* como *downstream* de este sistema (Streatfield, 2007; Moloney and Siloto, 2004; Siloto and Moloney, 2006 y 2007; Faye and Gomord 2010). Los rendimientos de producción (proceso *upstream*) no están determinados únicamente por la tasa de transcripción y traducción del gen de interés, sino también por la estabilidad del mRNA y de la proteína que son afectados también por las condiciones de crecimiento y/o cultivo. La cantidad de proteína biológicamente activa depende además de la capacidad del sistema de realizar las modificaciones incluyendo la maduración proteolítica, formación de uniones disulfuro, glicosilación, etc. como se mostró en el capítulo anterior. Las células vegetales presentan numerosas proteasas que aseguran diversas funciones tales como: de regulación, de maduración proteolítica y la estabilidad (vida media) de las proteínas (Schaller, 2004); siendo muy importantes para el metabolismo celular; aunque, en el caso de proteínas exógenas puede representar una amenaza contra la estabilidad o funcionalidad, al producir degradación completa o parcial, impidiendo alcanzar altos niveles de acumulación de proteínas recombinantes biológicamente activas (Doran, 2006; Goulet and Michaud, 2006; Badri et al., 2007). Mientras que algunas proteínas recombinantes se acumulan en altos niveles en la célula de la planta, otras tantas son hidrolizadas dando una gran variedad de productos heterogéneos, impactando negativamente en el rendimiento final, observándose en

algunos casos niveles de acumulación por debajo del 0,01% P/V de las Proteínas Totales Solubles (TSP), como por ejemplo con el interferón β , la eritropoyetina o el factor de crecimiento epidérmico (Daniell *et al.*, 2001). Diversas estrategias han sido consideradas en los últimos años para aumentar los niveles de acumulación de proteínas recombinantes y evitar su degradación proteolítica *in planta* (Benchabane *et al.*, 2008) entre ellas la retención en el retículo endoplásmico (ER) (Pagny *et al.*, 2003; Gomord and Faye, 2004; Vitale and Pedrazzini, 2005; Potula *et al.*, 2008), la expresión en cloroplastos (Danieeell *et al.*, 2005; Grevich and Daniell, 2005; Singh *et al.*, 2009), o en semillas de cereales (Stoger *et al.*, 2005; Rademacher *et al.*, 2009), también la inducción de *protein like-bodies* (Torrent *et al.*, 2009; Ramessar *et al.* 2008a y b; Takaiwa *et al.*, 2009), la fusión a zeolina (Mainieri *et al.*, 2004; Bellucci *et al.*, 2007; De Virgilio *et al.*, 2008) y a secuencias repetidas de péptidos similares a elastina (*elastin like peptides*, ELP) (Conley *et al.*, 2009; Floss *et a.*, 2009 y 2010).

Como se discutió en secciones anteriores una de las posibles estrategias para aumentar los niveles de acumulación es dirigir una proteína recombinante de interés dentro de Vacuolas de Almacenamiento de Proteínas o PSV. En este compartimiento las proteínas de reserva de semilla se acumulan en niveles muy altos (Muntz, 1998; Herman and Larkins, 1999). Aunque el mecanismo que determina el direccionamiento de proteínas de reserva a PSV ha generado un amplio debate y aún no ha sido clarificado, se ha demostrado que las proteínas de reserva poseen señales de direccionamiento tanto internas ubicadas en el extremo C-terminal que serían importantes para este direccionamiento (Castelli and Vitale, 2005; Vitale and Hinz, 2005; Nishizawa *et al.*, 2006; Pompa *et al.*, 2010). En este trabajo se planteó la hipótesis de evaluar si tanto la secuencia C-terminal como una secuencia interna de la globulina 11S de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*) son suficientes para dirigir genes reporteros a vacuolas, en particular no líticas, a fin de evitar la degradación proteolítica que ocurre en el apoplasto.

Cabe aclarar que aunque PSV es una organela típica de semillas, la coexistencia de estas y vacuolas líticas ha sido observada en células de la punta de raíz (Paris *et al.*, 1996) y de la aleurona de cebada (Swanson *et al.*, 1998), en células de mesófilo en empalizada y esponjoso de hojas de tabaco (Di Sansebastiano *et al.*, 1998, Park *et al.*, 2004) y de poroto (Park *et al.*, 2004) y, en meristemas de raíz en plántulas de cebada y

arveja (Olbrich *et al.*, 2007) en cambio, en células de mesófilo de arabisopsis se observa un único tipo vacuolar (Park *et al.*, 2004), de ahí el interés que se puso en este trabajo en generar plantas transgénicas para estudiar el direccionamiento de proteínas reporteras en distintos tipos celulares. También es importante aclarar que aunque actualmente el modelo más aceptado para el transporte de proteínas solubles a PSV es por una vía que atraviesa el aparato de Golgi como ha sido probado en arveja, tabaco, arabisopsis y girasol (Hinz *et al.*, 1999, Park *et al.*, 2004; Otegui *et al.*, 2006, Molina *et al.*, 2006) en zapallo (*Cucurbita maxima*) se ha descrito un transporte directo del retículo endoplásmico a PSV en vesículas denominadas PAC (*precursor accumulating vesicles*) (Hara-Nishimura *et al.*, 1998;). También se ha mostrado la existencia de vía Golgi independiente en *Vigna mungo* (Okamoto *et al.*, 2003) donde vesículas denominadas KDEL, transportan endopeptidasas a PSV en semillas en germinación.

Los objetivos de esta sección fueron identificar señales derivadas de una proteína de reserva que sean capaces de dirigir genes reporteros a vacuolas para posteriormente tratar de analizar en distintos tejidos y tipos celulares las características de las vacuolas (líticas y no líticas) a las que la proteína reportera fue transportada.

II.2 Resultados

II.2.1 Selección de las secuencias aminoacídica de la globulina 11S de amaranto que podrían determinar su direccionamiento a vacuolas y diseño de las construcciones.

Cuando este trabajo de tesis fue iniciado el modelo más aceptado acerca de los determinantes de direccionamiento vacuolar de proteínas de reserva, estaba asociados a la tendencia de estas proteínas a formar oligómeros en el retículo endoplásmico (Saalbach *et al.*, 1991; Muntz, 1998). La primer secuencia discreta descrita para este tipo de proteínas fue el tetrapéptido AFVY C-terminal de la faseolina (Frigerio *et al.*, 2001). En este trabajo se planteó la utilización de secuencias discretas derivadas de una globulina 11S de amaranto. El pentapéptido KISIA (AmhCt) fue escogido como una señal de direccionamiento vacuolar putativa, teniendo en cuenta los resultados de faseolina (Frigerio *et al.*, 2001) y además las reglas de señales en C-terminal (ctVSS) que son a menudo ricos en aminoácidos hidrofóbicos (Roger *et al.*, 1998; Matsuoka and Neuhaus, 1999). La secuencia interna NIFRGF (AmhH1N) de la amarantina fue escogida porque se parece a la señal NPIRL/P encontrada en los inhibidores de proteasas del tipo Kunitz o papain-cistein proteasas Matsuoka and Neuhaus, 1999) que dirige a vacuolas tipo líticas y también, porque es muy similar a la señal LIRP encontrada en la ricinina, una lectina de ricino (*Ricinus communis*) que se acumula normalmente en PSV (Jolliffe *et al.*, 2003).

Una de las hipótesis que se formulaba para tratar de explicar la diferencia en los tamaños de los VSSs descritos era que el tamaño del gen reportero empleado podría afectar los resultados obtenidos (Saalbach *et al.*, 1991; Frigerio *et al.*, 2001) por eso se decidió trabajar con dos clases de construcciones: unas conteniendo el gen codificante para la proteína fluorescente verde (GFP; aprox. 200 residuos de aminoácidos) y otra conteniendo además el gen codificante para la β -glucuronidasa (GUS; aprox. 600 residuos de aminoácidos) construcciones GFP-GUS. Como era necesario dirigir estas proteínas reporteras a la vía secretoria se decidió utilizar el vector pRTL202 (Carrington *et al.*, 1991), el cual posee el péptido señal de la cadena pesada de una inmunoglobulina secretoria de ratón (PS), que se sabe funciona bien en células vegetales, ya que este tipo

de señales está ampliamente conservado en eucariotas superiores. Para lograr buenos niveles de expresión se utilizó el promotor constitutivo 35S CaMV (2E-35S) con doble *enhancer* y su señal de poliadenilación (T-35S). Además, se utilizaron como controles construcciones GFP y GFP-GUS fusionado por un lado, con la señal KDEL de retención/recuperación en ER (GFP-ER y GFP-GUS-ER, respectivamente) y por otro, con la señal de direccionamiento vacuolar de la quitinasa A de tabaco (GFP-GUS-ChiCt) (Neuhaus *et al.*, 1991), todas ellas clonadas también dentro del vector pRTL202 (Figura 1).

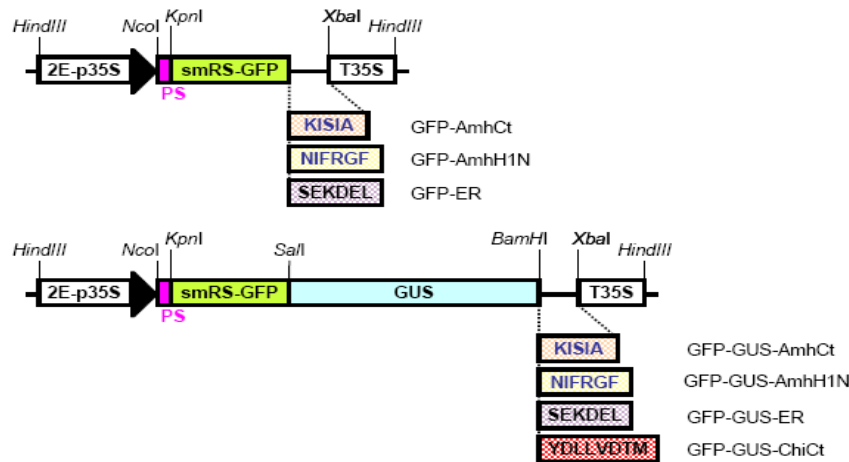


Figura 1: Representación esquemática de las construcciones reporteras utilizadas: las mismas fueron clonadas dentro del vector pRTL202, sitios *KpnI* y *XbaI*. A la derecha se encuentra la nomenclatura dada para los plásmidos obtenidos. Las construcciones no se encuentran graficadas a escala. Para las referencias ver texto.

II.2.2 Transformación de una suspensión celular de *Arabidopsis* con los plásmidos conteniendo los genes reporteros fusionados a las señales putativas de direccionamiento vacuolar

Se partió de una suspensión células de mesófilo de *Arabidopsis* T87 en crecimiento activo y se obtuvieron protoplastos que fueron transformados con las construcciones mencionadas anteriormente empleando, PEG como se indicó en materiales. La expresión del gen reportero GFP fue analizado a distintos tiempos: 12-48 horas post-transfección, por microscopía confocal de escaneo láser.

Las construcciones controles de retención en retículo (GFP-ER Y GFP-GUS-ER) mostraron una distribución perinuclear, formando una característica red reticular, que es típico del patrón de ER (Figura 2A y B). Las células transfectadas con las

construcciones reporteras GFP o GFP-GUS fusionadas a la señal de amarantina AmhCt o AmhH1N, fueron detectadas inicialmente en ER (12 horas post-transfección) y, posteriormente en vacuolas luego de 36 horas (Figura 2C a F). Resultados similares fueron reportados para GFP fusionada a la señal de direccionamiento vacuolar de la quitinasa A de tabaco o la faseolina (Di Sansebastiano *et al.*, 1998 y Frigerio *et al.*, 1998; respectivamente).

Estos resultados muestran que el pentapéptido C-terminal KISIA o el determinante interno H1N de la amarantina, son capaces de direccionar las proteínas reporteras GFP y GFP-GUS a vacuolas en una suspensión de protoplastos de *Arabidopsis* T87. Sin embargo, esta suspensión de células indiferenciadas, presenta un único tipo de vacuolas ya que los controles con señales de direccionamiento a vacuolas de reserva y vacuolas líticas fueron dirigidos también al mismo compartimiento (Silvana Petruccelli 2007), por lo que es necesario evaluar estas señales en un sistema que presente los distintos tipos de vacuolas, como es la utilización de plantas.

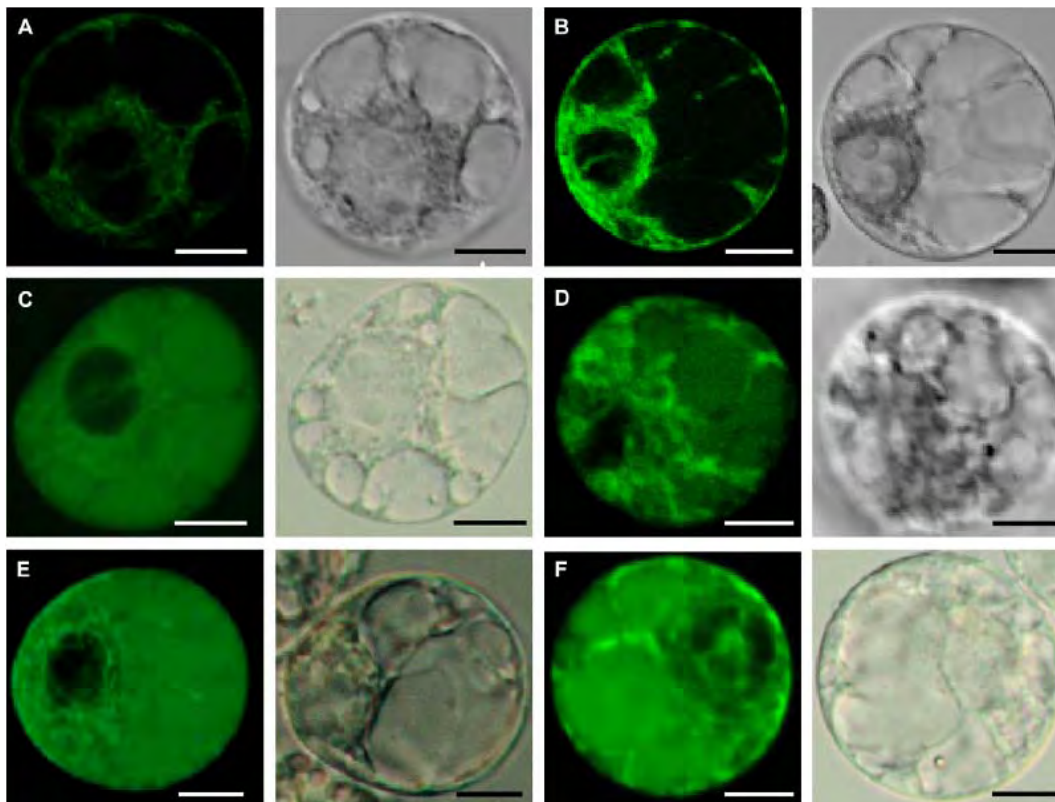


Figura 2: Microscopía confocal de fluorescencia y contraste diferencial de interferencia (DIC). Imágenes de *Arabidopsis* expresando: (A) GFP-ER; (B) GFP-GUS-ER; (C) GFP-AmhCt; (D) GFP-GUS-AmhCt; (E) GFP-AmhH1N; (F) GFP-GUS-AmhH1N. Escala 10 μ m.

II.2.3 Agroinfiltración de hojas de *Nicotiana tabacum* (expresión transitoria) con agrobacterium llevando los plásmidos conteniendo los genes reporteros fusionados a las señales putativas de direccionamiento vacuolar

Para la expresión transitoria en hojas de tabaco, se realizó el subclonado del *cassette* completo desde pRTL202 (Figura 1, sitios *Hind III*), con las construcciones doble reportero GFP-GUS, al vector binario pBLTi 121 (Gomord *et al.*, 1996) Ver Materiales y Métodos 2.4. Los plásmidos obtenidos fueron transformados mediante electroporación en *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y se analizó que no hubieran sufrido reordenamientos por mapeo por restricción (datos no mostrados).

La expresión transitoria se realizó en hojas de *N. tabacum* y se evaluó luego de 48hs y 72hs post-infiltración por microscopía confocal de fluorescencia. En las imágenes obtenidas desde hojas agroinfiltradas, se observó fluorescencia verde superior del fondo o auto-fluorescencia que es emitida mayoritariamente por la clorofila. No obstante, la fluorescencia debida a GFP de las construcciones GFP-GUS-AmhCt y GFP-GUS-AmhH1N (Figura 3, D y E respectivamente), así como el control vacuolar GFP-GUS-ChiCt (Figura 3, C), a los tiempos analizados mostraron una distribución propia del ER, siendo equivalente a la construcción control GFP-GUS-ER que se encontró en esta organela ya que exhibió una distribución perinuclear y formación de la red reticulada característica (Figura 3, B).

Mediante expresión transitoria en hojas de tabaco se observó entonces que las construcciones doble reportero con señales vacuolares, no llegaban a su destino final quedando retenidas en el ER, en contraste con los resultados mostrados anteriormente para la expresión transiente en células de mesófilo de *Arabidopsis T87* donde a tiempos comprendidos entre las 48-72hs postransfección, se observaba un patrón predominantemente vacuolar. Esta diferencia, podría atribuirse a que en la transformación mediada por *Agrobacterium* la llegada del T-DNA al núcleo, transcripción y traducción es más lenta, siendo más notable cuando los genes a expresar son de gran tamaño. No obstante, con estos resultados, se corroboró que las construcciones doble reportero en el vector binario eran funcionales y se decidió estudiar la expresión y el direccionamiento a tiempos más largos, para los que la transformación estable es más adecuada.

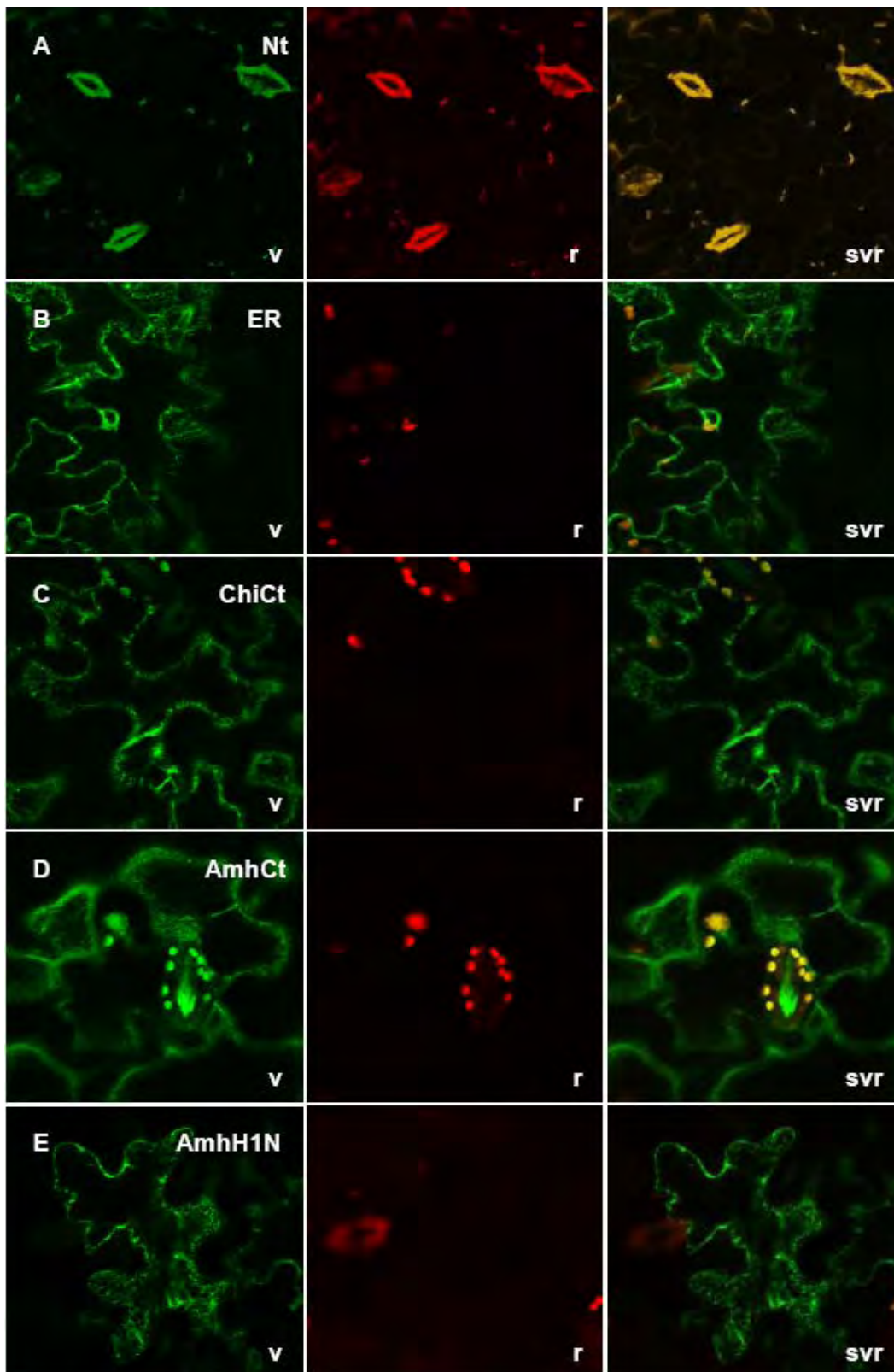


Figura 3: Microscopía confocal de escaneo laser en cortes de hoja agroinfiltradas con los plásmidos: A) medio de infiltración (control sin transformar, Nt); B) pBLTi GFP-GUS-ER; C) pBLTi GFP-GUS-ChiCt; D) pBLTi GFP-GUS-AmhCt y E) pBLTi GFP-GUS-AmhH1N. La referencia (v) indica las imágenes obtenidas para la fluorescencia verde, con (r) para la roja y (svr) corresponde a la superposición de las dos imágenes anteriores.

II.2.4 Obtención de plantas transgénicas de *N. tabacum* con las fusiones GFP-GUS-señal vacuolar (expresión estable)

II.2.4.1-Transformación de discos de hojas de *Nicotiana tabacum* con agrobacterias y regeneración de plantas transgénicas

Para la obtención de plantas transgénicas (expresión estable), los plásmidos binarios pBLTiGFP-GUS-AmhCt, pBLTiGFP-GUS-AmhH1N, pBLTiGFP-GUS-ER y pBLTiGFP-GUS-ChiCt fueron electroporados en la cepa de *Agrobacterium t.* LBA 4404. Luego de analizar que los plásmidos recuperados de la agrobacteria no hubieran sufrido reordenamientos, discos de hojas de tabaco fueron transformados como se detalló en la sección Materiales y Métodos secc.2.16. La regeneración de plantas de *N. tabacum* transformadas fue muy problemática. En la mayoría de los experimentos independientes de transformación se observó generación de callos resistentes al antibiótico selector (kan 100mg/l) sin embargo, mostraban una mala o nula diferenciación a plántulas no observándose este problema en los explantos sin transformar (control de viabilidad y regeneración) ni en transformaciones realizadas con una agrobacteria llevando el GUS-intrón. Para tratar de mejorar la regeneración se eliminó el uso de kanamicina como medio de selección de explantos positivos ya que se podían emplear los genes reporteros, sin embargo los resultados no fueron mejores por lo que se mantuvo el uso de este antibiótico incrementándose el número de explantos en cada experimento. Se observó que aproximadamente el 70% los explantos transformados con la construcción GFP-GUS-AmhH1N generaba callos resistentes o plántulas mal formadas. El número de callos transformados fue aún más bajo (30%) para la construcción GFP-GUS-AmhCt y nulo para la construcción GFP-GUS-ChiCt.

Luego de varios ensayos independientes de transformación se obtuvieron plántulas resistentes en buenas condiciones, únicamente con los vectores pBLTiGFP-GUS-AmhCt y pBLTiGFP-GUS-AmhH1N, que fueron sucesivamente repicados en los distintos medios de regeneración con el agente selector, hasta su rusticación en macetas. A cada una de las líneas de plantas obtenidas con los distintos constructos se las llamó como: *Nt*-GFP-GUS-AmhCt a las transformadas con la construcción de señal KISIA y *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N para NIFRGF.

II.2.4.2 Análisis molecular de las plantas transgénicas *Nt*-GFP-GUS-AmhCt y *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N obtenidas para confirmar la presencia del transgen.

De las distintas líneas de plantas transformadas obtenidas se realizó la extracción de DNA genómico según Dellaporta *et al.* (1983). Como controles positivos se utilizaron los plásmidos pBLTiGFP-GUS-AmhCt y pBLTiGFP-GUS-AmhH1N. En la Figura 4, se muestran los resultados de amplificaciones del DNA genómico de las distintas líneas con los primers 5'pRTGFP y 3'Amh-señal de direccionamiento, que permiten amplificar el gen codificante para GFP. En la misma, puede observarse que cuando se emplea como molde el DNA extraído de tres líneas independientes *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N se obtiene una banda de aproximadamente 600bp correspondiente al gen reportero GFP (Figura 4, calles 3 a 8) y se visualiza también la amplificación del control positivo (Figura 4, calle 16). Por otro lado, las dos líneas independientes *Nt*-GFP-GUS-AmhCt analizadas con los primers 5'pRTGFP y 3'AmhCt, también dan resultados positivos para la amplificación del gen GFP (Figura 4, calles 9 a 12) así como en el control positivo (Figura 4, calle 15); sin embargo, solamente para la primera línea dio amplificación en el duplicado. Teniendo en cuenta que los duplicados se realizaron con moldes de extracciones genómicas independiente desde distintas hojas de la misma planta, el mismo podría contener impurezas que inhibieron la amplificación o que se haya fragmentado el gen reportero en la extracción, o bien tratarse de una planta quimérica.

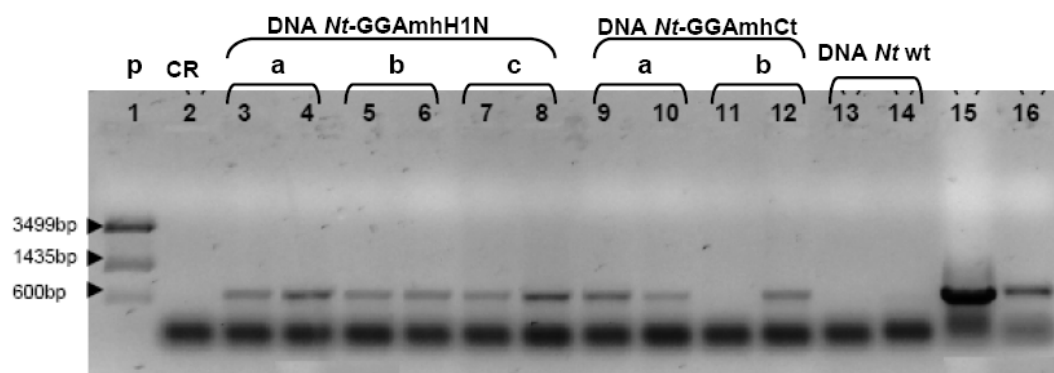


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa, determinación de transgénesis por PCR. (P) corresponde al patrón; calle 2 (CR) control de reactivos; calles de 3-8 productos de amplificación con DNA de *Nt*-GFP-GUSAmhH1N y primer reverso 3'AmhH1N; calles de 9-12 con DNA de *Nt*-GFP-GUSAmhCt y primer reverso 3'AmhCt; calle 13 con DNA *Nt*-salvaje (wt) y primer reverso 3'AmhCt; calle 14 con DNA *Nt*-wt y primer reverso 3'AmhH1N; calle 15 pBLTi-GFP-GUSAmhCt y primer reverso 3'AmhCt y; en calle 16 con pBLTi-GFP-GUSAmhH1N y primer reverso 3'AmhH1N. (a), (b) y (c) corresponden a líneas independientes de plantas.

Como resultado de la transformación estable de *N. tabacum* se obtuvieron entonces tres líneas independientes de plantas (generación F₀) con la construcción GFP-GUS-AmhH1N, las que fueron denominadas: *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N [A], [B] y [C] respectivamente y, por otro lado, dos líneas independientes con la construcción KISIA, plantas *Nt*-GFP-GUS-AmhCt cuyas líneas independientes fueron designadas [A] y [B] respectivamente. Todas ellas, fueron rustificadas en macetas dando flores y semillas luego de ocho semanas. Estas, una vez maduras, fueron esterilizadas y cultivadas en mGT complementado con 100µgr/ml del antibiótico selector kanamicina. Todas las semillas fueron viables, dando plántulas que luego fueron pasadas a macetas para rustificar (generación F₁).

El número de líneas independientes obtenidas fue muy inferior al obtenido con los controles sin transformar, esta baja eficiencia de regeneración indicaría que la transformación desde disco de hojas tiene un efecto negativo en la diferenciación celular de los transgenes al utilizar reporteros dirigidos a vacuola, resultados similares de baja eficiencia de regeneración fueron publicados en trabajos previos por Di Sansebastiano *et al.* (2007) al transformar *N. tabacum* y *benthamiana* con GFP-ChiCt y Aleu-GFP (ssVSS de la aleurina de cebada).

II.2.5 Estudio del patrón espacial de expresión del gen reportero de la β-glucuronidasa de las plantas transgénicas *Nt*-GFP-GUS-AmhCt y *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N

Para determinar la actividad del transgen en distintos tejidos de las líneas transgénicas obtenidas, se cultivaron plántulas *Nt*-GFP-GUS-AmhCt o *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N correspondientes a la generación F₁, en medio de cultivo, conteniendo kanamicina como agente selector, hasta alcanzar tres semanas. Luego de ese período, se visualizó histoquímicamente la actividad β-glucuronidasa (GUS) utilizando el sustrato específico para la enzima X-glu (ácido 5-Bromo-4-cloro-3-indol-β-D-glucurónico), en plántulas enteras. Cabe aclarar que el producto primario de hidrólisis del X-glu, el 5-Bromo-4-cloro-3-indol es incoloro y soluble, pero es oxidado y dimerizado para formar el producto final de la reacción que es de color azul índigo. Para que la tinción histoquímica refleje los lugares donde efectivamente hay actividad β-glucuronidasa, debe favorecerse la rápida oxidación del producto primario, para minimizar su difusión,

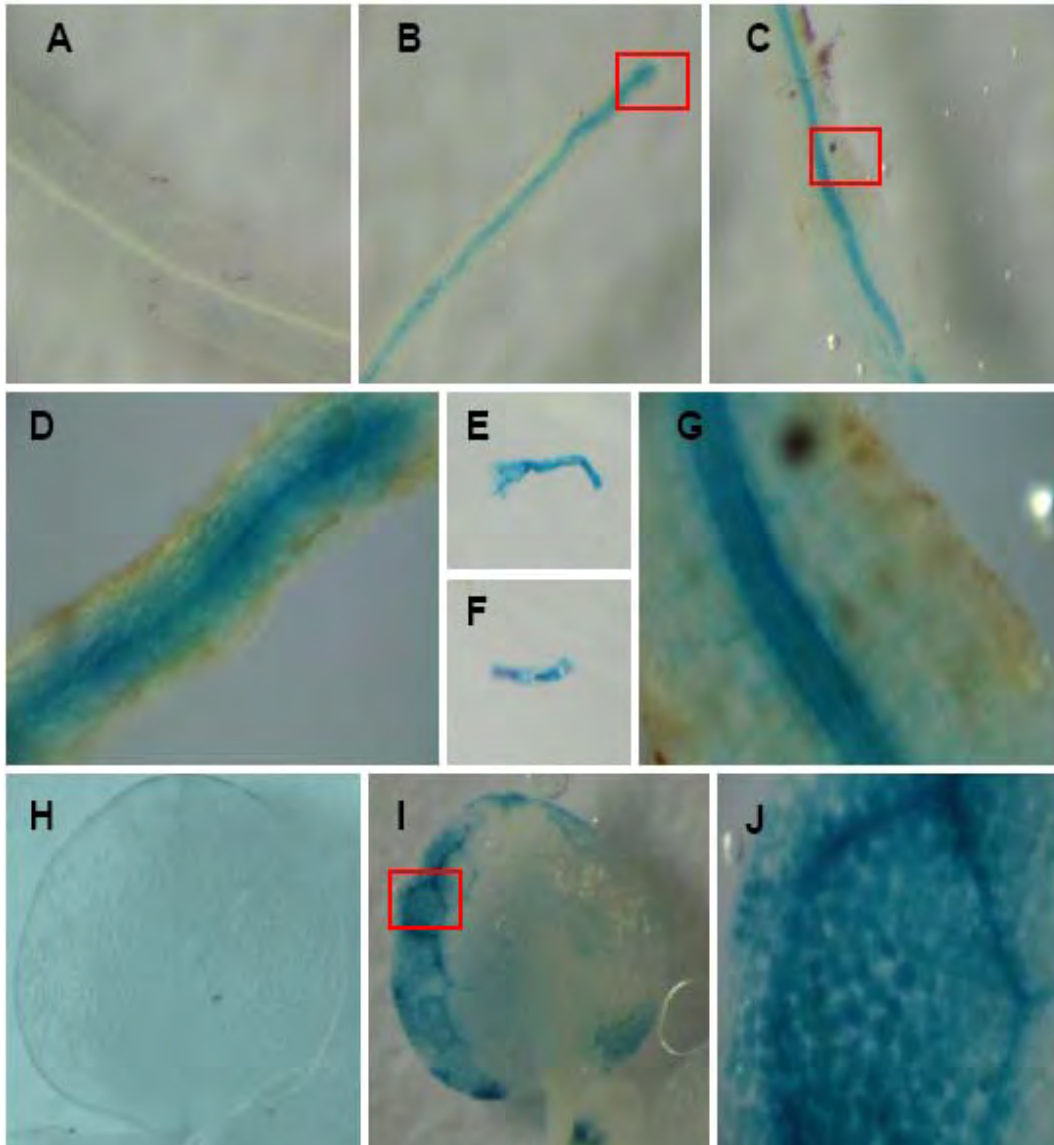


Figura 5: Micrografías de cortes de plantas transgénicas F1 a los que se les realizó el ensayo histoquímica la actividad β -glucuronidasa. La observación se realizó en: A) Control en raíces de plantas *Nt*. salvajes; actividad en raíces transgénicas en B) *Nt*-GFP-GUS-AmhCt; C) *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N. Los recuadros en rojo indican la región ampliada en D) y G) de las figuras B y C, respectivamente. Así como también en E) y F) se observa en detalle la coloración de los tricomas en raíces *Nt*-GFP-GUSAmhH1N y AmhCt respectivamente. La coloración en hojas se contempla en H) para el control negativo (*Nt* salvaje) e I) transgénica *Nt*-G-AmhH1N. Se detalla en J) un acercamiento del recuadro indicado en I). El aumento para A, B, C, H e I es de 80X y, de 320X para la ampliación de los recuadros.

efecto que se logra incorporando una mezcla ferri-y ferrocianuro en el buffer de reacción. Además, el buffer empleado debe contener metanol para facilitar la penetración, que es otra de las variables a considerarse al realizar este tipo de análisis, ya que muchas veces la falta de color puede indicar que el sustrato no llegó a la célula o alternativamente la cantidad de producto formado no es suficiente para que se observe el color. Aún empleando un promotor con actividad constitutiva como el 35S la

observación de actividad GUS en células de mesófilo de hojas suele estar por debajo de los límites de sensibilidad del método (Petrucci *et al.*, 2001).

En las líneas transgénicas *Nt-GFP-GUS-AmhCt*, se observó coloración azul correspondiente a la actividad de la β -glucuronidasa solamente en la punta de raíz, mayoritariamente distribuida en el interior de las células del meristema radicular, epidermis, haces vasculares y tricomas (Figura 5B, D y F) no así en tallos y hojas. Por otro lado, en plantas *Nt-GFP-GUS-AmhH1N* se observó un patrón de coloración en la punta radicular, en la epidermis, haces vasculares y tricomas (Figura 5C y E, respectivamente) observándose además difusión en el apoplasto (Figura 5G) hecho que puede atribuirse a la mayor actividad β -glucuronidasa de la línea *Nt-GFP-GUS-AmhH1N* en relación a *Nt-GFP-GUS-AmhCt*. Asimismo, las líneas *Nt-GFP-GUS-AmhH1N* presentaron actividad β -glucuronidasa en hojas (Figura 5I y J) sin embargo, la distribución en ellas no fue en el total de la superficie foliar, sino que fue mayoritariamente en los bordes de la hoja y nervaduras hecho que puede atribuirse a una penetración no uniforme del sustrato en el tejido analizado (Jefferson *et al.*, 1987). Además, si bien se sabe que el promotor 35S CaMV, es un promotor fuerte y que se expresa de manera constitutiva en la mayoría de los tejidos vegetales, el mismo presenta mayor nivel expresión en haces vasculares y tricomas (Benfey *et al.*, 1990).

Con estos resultados podemos deducir entonces que en las líneas transgénicas *Nt-GFP-GUS-AmhH1N* el gen reportero de la β -glucuronidasa es funcional y presenta actividad en hojas y raíces, aunque no en tallos. La actividad β -glucuronidasa en raíz es superior a la observada en hoja, como se manifiesta por la mayor difusión del producto de reacción en este órgano. En contraste, las plantas *Nt-GFP-GUS-AmhCt* solo presentaron actividad enzimática en raíz. La falta de señal en hojas de las plántulas *Nt-GFP-GUS-AmhCt* podría deberse a que la actividad está por debajo de la sensibilidad del método o bien el reportero se expresa pero es rápidamente degradado. Podemos agregar además, que para ambas construcciones, la visualización de coloración siempre fue mayor en los haces vasculares, tanto en raíz, como en nervaduras de hojas, hecho que coincide con el patrón de expresión del promotor 35S (Benfey *et al.*, 1990; Petrucci *et al.* 2001).

Los patrones de expresión observados para las plántulas *Nt-GFP-GUS-AmhCt* y *GFP-GUS-AmhH1N*, corresponden a una localización intracelular lo que muestra el efecto de la señal de direccionamiento, ya que si la misma no funcionara seguiría el camino “*default*” que es la secreción (Denecke *et al.*, 1990). Debido a las limitaciones de la técnica por difusión del producto primario de reacción y su baja sensibilidad (Jefferson *et al.*, 1987) el estudio de la localización intracelular se realizará empleando el reportero fluorescente.

II.2.6 Estudio del patrón espacial de expresión del gen reportero GFP de las plantas transgénicas *Nt-GFP-GUS-AmhCt* y *Nt-GFP-GUS-AmhH1N*

La proteína verde fluorescente (GFP) permite la visualización directa de la localización subcelular de proteínas de fusión en células vivas y en tiempo real. Así, la localización de distintas proteínas de fusión a GFP en el sistema secretorio ha sido estudiada en diferentes órganos de plantas superiores. Sin embargo, la fluorescencia del reportero no ha podido ser observada en el lumen de vacuolas, especialmente ácidas, de algunos órganos de plantas (Flückiger *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2003; Samalova *et al.*, 2006). Esto se atribuye principalmente a la inestabilidad de la proteína reportera en un entorno ácido (Tamura *et al.*, 2003) o, a la acción de proteasas fotodependientes (Flückiger *et al.*, 2003). No obstante, en *N. benthamiana* y *A. thaliana*, la fluorescencia de GFP dirigida a vacuolas, ha sido observada de manera estable en vacuolas de plantas transgénicas al ser incubadas bajo condiciones de oscuridad, siendo esta degradada con menos de 1 hora de iluminación, especialmente si la misma era azul (Tamura *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta lo antedicho, para la observación de fluorescencia en los distintos órganos de las plantas transgénicas *Nt-GFP-GUS-AmhCt* y *Nt-GFP-GUS-AmhH1N* (F₁), se ajustaron las condiciones previas de cultivo e incubación, cultivándose inicialmente en macetas con fotoperíodo normal de 16/8hs luz, y luego de 4 semanas de rustificación, ser incubadas en cámara oscura. De este modo la falta de fluorescencia, en las plantas transgénicas de *N. tabacum* y, al igual que en *N. benthamiana* y *A. thaliana*, pudo revertirse al realizar una incubación de al menos 48hs en oscuridad previa observación de fluorescencia.

II.2.6.1.1 Localización subcelular de GFP en hojas de plantas transgénicas *Nt*-GFP-GUS-AmhCt y *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N por microscopia confocal de fluorescencia.

Plantas *Nt*-GFP-GUS-AmhCt y *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N pertenecientes a la filial F₁, fueron cultivadas en invernadero con un fotoperíodo normal (16hs luz) durante 4 semanas y colocadas en la oscuridad 48 horas antes de la observación por microscopía de fluorescencia. Para la observación se realizaron cortes de la hoja que fueron colocados en la platina del microscopio con la superficie abaxial de hojas hacia arriba empleándose los filtros para GFP indicados en Materiales y Métodos secc. 2.19 (Figura 6). Paralelamente, éstas plantas transgénicas fueron agroinfiltradas con una proteína fluorescente roja mCherry (Shaner *et al.*, 2004), fusionado con la proteína intrínseca de tonoplasto γ (mCherry- γ -TIP, Nebenfuhr *et al.*, 2007) que se localiza en vacuolas de tipo líticas.

En los cortes de hoja de plantas *Nt*-GFP-GUS-AmhCt y H1N, luego de la microscopía, se observó fluorescencia correspondiente a GFP superior al fondo, donde la construcción AmhCt es visualizada de forma definida en el contorno de las membranas celulares con el filtro verde (Figura 6B y C, izquierda), no observándose con el rojo como autofluorescencia (Figura 6B y C, centro) y, de la superposición de ambas imágenes se puede contemplar que se mantiene diferencialmente del fondo la fluorescencia verde propia de la expresión del reportero GFP. Por el contrario, al observar la fluorescencia emitida con la construcción GFP-GUS-AmhH1N, si bien la misma se visualiza en el contorno celular, también se observa que esta se distribuye en algunas zonas en forma de pequeñas estructuras esféricas hacia el interior celular (Figura 6C, flechas).

Por otro lado, al analizar las imágenes obtenidas en las plantas transgénicas co-infiltradas con mCherry- γ -TIP, se puede observar la fluorescencia del reportero rojo dispersa definitivamente en el interior celular, no así en los límites de las mismas (Figura 7A y B, centro) propio de una localización en vacuolas de tipo líticas o vacuola central (Di Sansebastiano *et al.*, 2001; Brandizzi *et al.*, 2004). Al superponer los canales verdes y rojo de estas imágenes, se manifiesta la colocalización en tonos de amarillo/naranja, de la combinación de fluorescencia verde y roja. En este caso, podemos observar que la

fluorescencia verde debida a GFP con la señal AmhCt, se visualiza en el límite celular a pesar de la superposición de imágenes (Figura 7A, flecha), así como también con AmhH1N, aunque con esta última se observa además co-localización parcial en algunas zonas (Figura 7B, flechas).

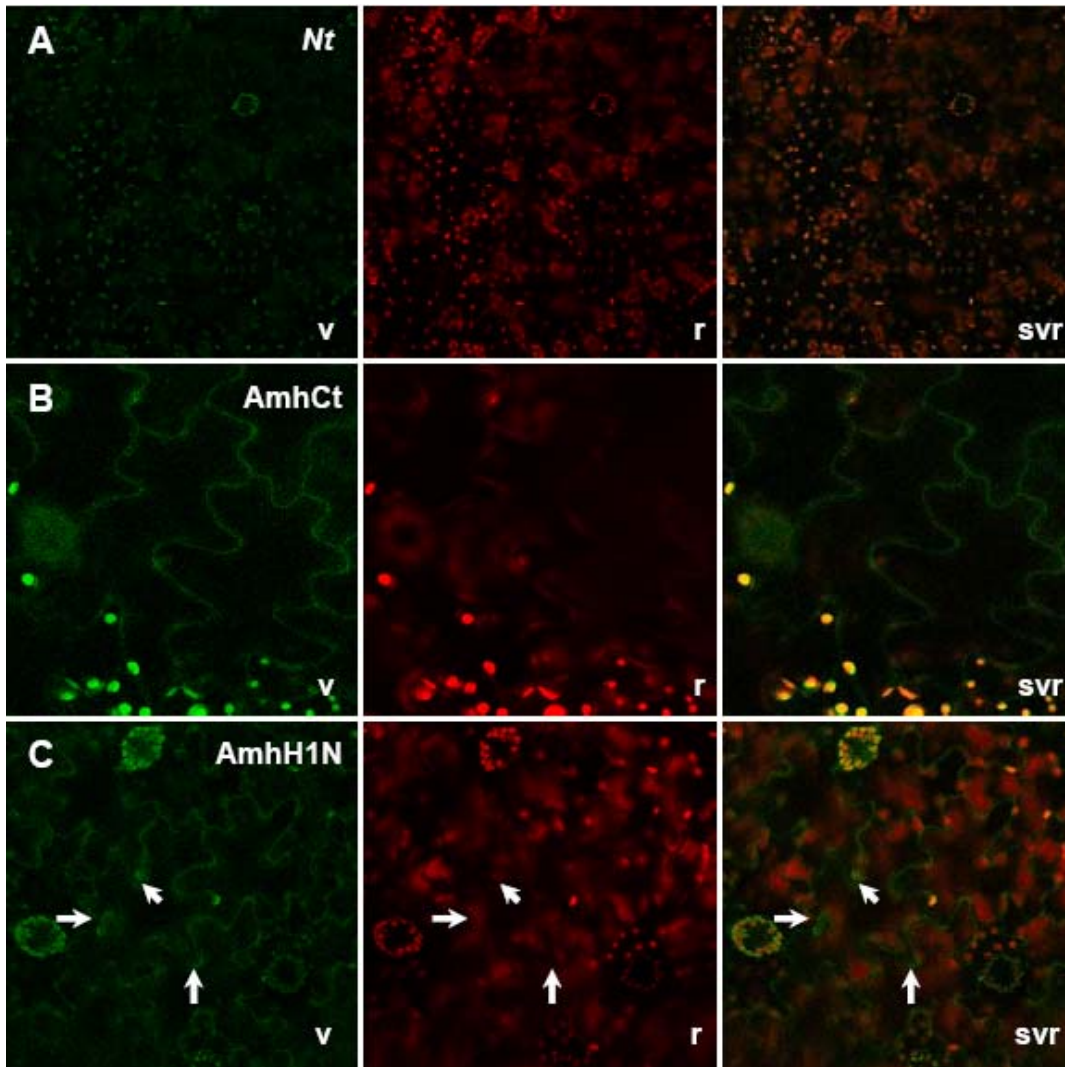


Figura 6: Análisis de la expresión de GFP por microscopía confocal de fluorescencia, en cortes de hojas de plantas salvajes, Nt en (A), en plantas transgénicas *Nt*-GFP-GUS-AmhCt en (B) y, en plantas *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N en (C). La imagen de la izquierda corresponde al canal verde (v) para GFP, al centro el rojo (r, autofluorescencia) y, a la derecha corresponde a la imagen formada por la superposición de ambos canales (svr).

Con estos resultados, podemos decir entonces que en hojas la proteína GFP con la señal AmhCt no se localiza en vacuolas de tipo líticas o vacuola central, ya que no colocaliza con el marcador fluorescente mCherry- γ -TIP (Nebenführ *et al.*, 2007) Contrariamente, al utilizar el determinante interno de la amarantina H1N, se observa en

algunas zonas del límite celular que existe colocalización con el fluoróforo rojo; un patrón similar es informado para la expresión de la proteína intrínseca de tonoplasto de vacuolas líticas fusionado a GFP (γ -TIP-GFP, *Tonoplast Intrinsic Proteins-GFP*) (Saito *et al.*, 2002). No obstante, al utilizar el reportero mCherry- γ -TIP se observa por un lado que, no hay colocalización en el interior celular y por otro, que en todos los casos la intensidad de la fluorescencia verde emitida al utilizar el determinante interno es relativamente menor a la señal AmhCt. Uno de los parámetros que puede ser tomado en consideración para esto es el pH. Un entorno ácido (como en el interior de vacuolas líticas), podría alterar el equilibrio de protonación de la proteína GFP volviéndola inestable, marcando una disminución en la fluorescencia, no así para la proteína roja que es estable en el lumen vacuolar (Samalova *et al.*, 2006). Asimismo, a pH bajos hay aumento de la actividad de ciertas proteasas pH-dependientes (equivalentemente a las proteasas luz-dependientes), concordando con lo publicado por Flückiger *et al.* (2003) donde solo observa fluorescencia verde al utilizar inhibidores de proteasas.

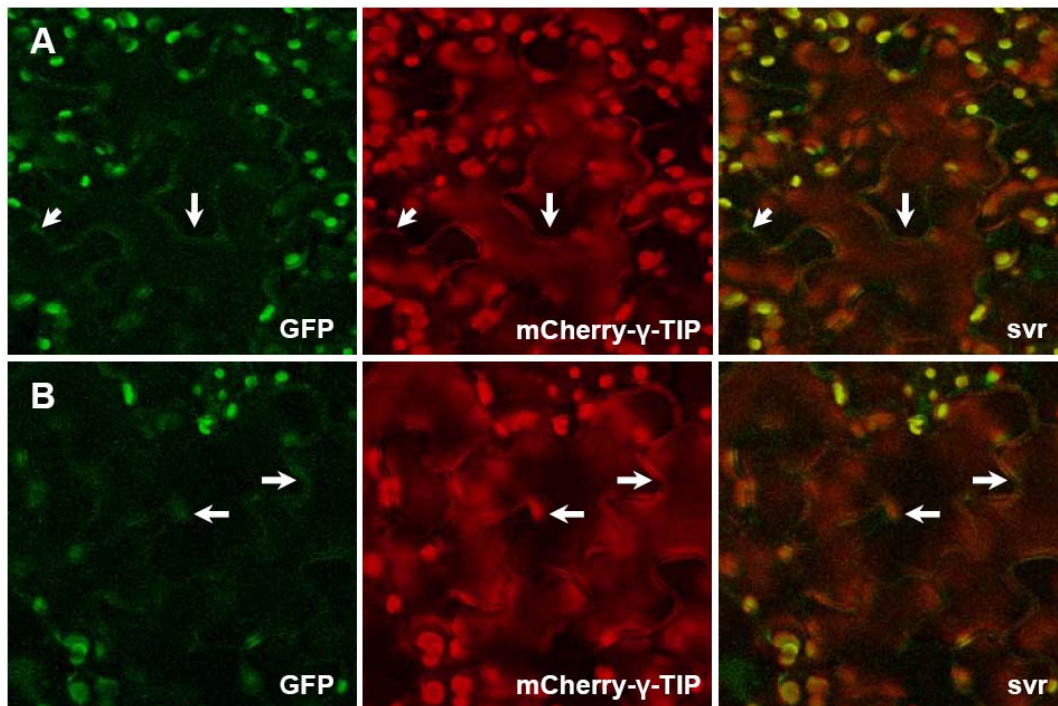


Figura 7: Co-localización de mCherry- γ -TIP en cortes de hoja de plantas transgénicas *Nt*-GFP-GUS-AmhCt en (A) y *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N en (B). A la derecha se observa la fluorescencia del canal verde (GFP), al centro la roja (mCherry- γ -TIP) y la imagen de la derecha muestra la superposición de ambas (svr). La flecha indica el límite celular.

Indistintamente de la localización vacuolar del reportero GFP dirigido por las señales de la amarantina en las plantas transgénicas, este presentó relativamente una tenue emisión de fluorescencia (Figura 6 y 7) al compararse con los resultados

obtenidos con expresión transitoria (Figura 3), donde la proteína reportera se localizó en ER indistintamente de la señal fusionada; sin embargo, la intensidad de la fluorescencia mayor en estas últimas podría deberse a una mayor estabilidad de la proteína fluorescente o un mayor nivel de acumulación al localizarse en ER, no así en vacuolas. Aunque en los ensayos de expresión transiente también existe el problema de la sobrecarga de los sistemas de transporte.

II.2.6.1.2 Localización subcelular de GFP en raíces de plantas transgénicas *Nt*-GFP-GUS-AmhCt y *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N por microscopia confocal de fluorescencia

Para evaluar la expresión y localización subcelular del gen reportero GFP con las señales vacuolares AmhCt o AmhH1N, dentro de raíces de plantas transgénicas, semillas de todas las líneas de la generación F₀ fueron germinadas y crecidas en medio con el agente selector kanamicina durante 4 semanas. Luego de ese período, cortes de raíces fueron observados directamente por microscopía fluorescente para evaluar la expresión del transgen. En paralelo, con el fin de evaluar la localización subcelular, raíces de plantas *Nt*-GFP-GUS-AmhCt y H1N con cuatro semanas de crecimiento, se incubaron con el colorante Rojo Neutro (RN; 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) durante 30 minutos (Figura 8). El RN es ampliamente utilizado en varios sistemas biológicos como un fluorocromo en la tinción de células vivas. La principal ventaja del RN es que penetra rápidamente en tejidos vivos de raíz, siendo la forma desprotonada de fácil ubicación en la membrana plasmática y tonoplasto, y particularmente la forma protonada, por su carácter ácido, es retenido en vacuolas líticas (Oparka, 1991; Timmers *et al.*, 1995; Ehara *et al.*, 1996). Esta propiedad, hace que el RN sea utilizado como marcador acidotrópico por su acumulación en vacuolas de tejidos vegetales como *Phaseolus vulgaris*, *Allium cepa*, *A. porrum* y *Arabidopsis thaliana* (Smith and Raven, 1979; Timmers *et al.*, 1995; Di Sansebastiano *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 1998; Ngo *et al.*, 2005). Asimismo, al ser excitado con luz UV presenta un pico de emisión máxima en 590nm para vacuolas y en 600nm para protoxilema, metaxilema y banda de Casparian, siendo una señal inequívoca al comparar con la fluorescencia de GFP (máximo de emisión entre 485-550nm)(Dubrovsky *et al.*, 2006).

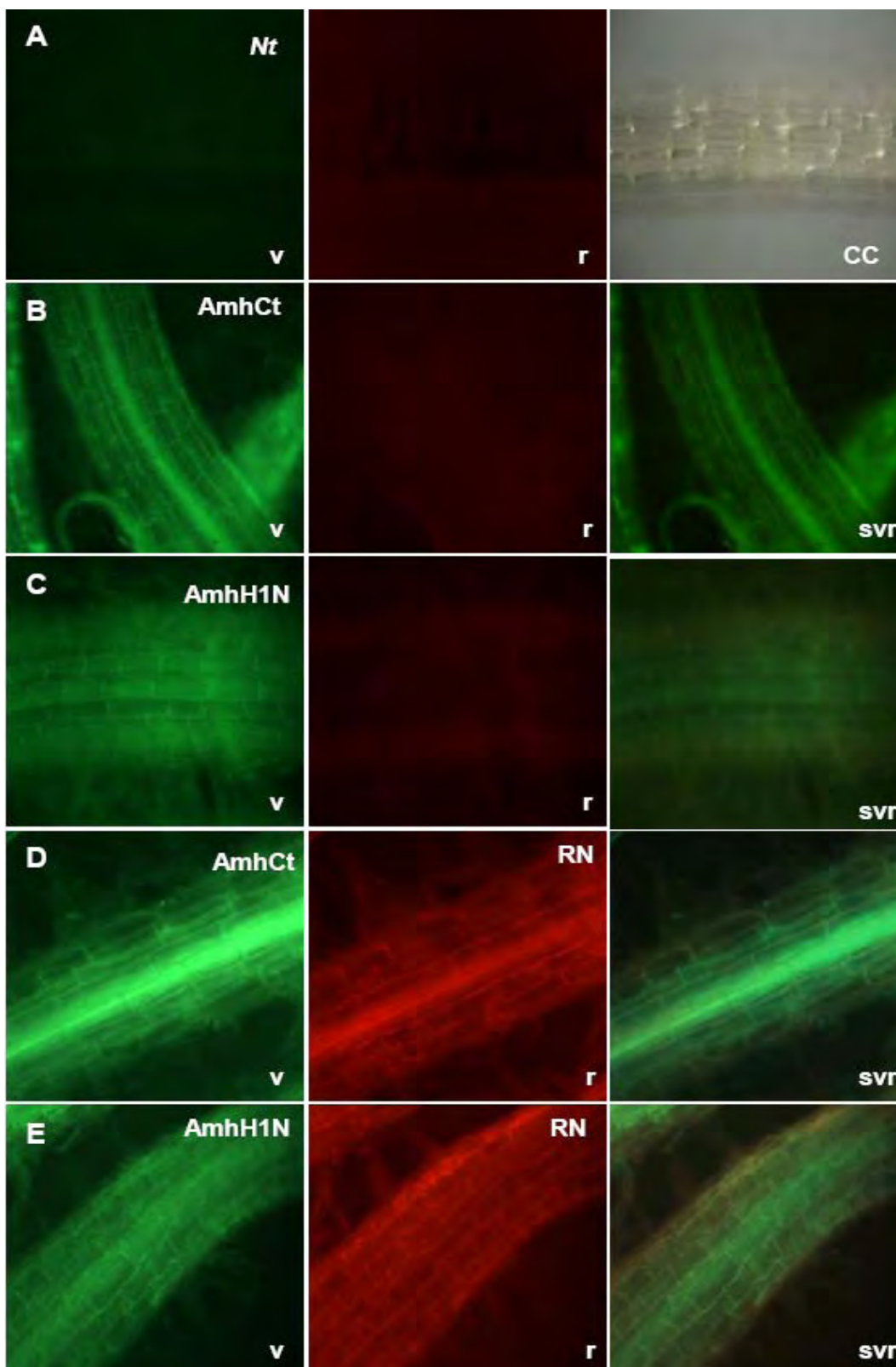


Figura 8: Micrografías confocal de fluorescencia de raíces plántulas *Nt*-GFP-GUS-*AmhCt* y *Nt*-GFP-GUS-*AmhH1N*. En A) Control negativo en raíces de plantas salvajes (*Nt*); en B) transgénicas *Nt*-GFP-GUS-*AmhCt* y en C) *Nt*-GFP-GUS-*AmhH1N*. Para D) y E) raíces transgénicas *Nt*-GFP-GUS-*AmhCt* y *Nt*-GFP-GUS-*AmhH1N* respectivamente, tratadas además con Rojo Neutro, RN. La referencia (v) indica las imágenes obtenidas para la fluorescencia verde, con (r) para la roja y (svr) corresponde a la superposición de las dos imágenes anteriores excepto, en el control siendo la imagen obtenida en campo claro (CC).

En las imágenes B) y C) de la Figura 8, podemos apreciar fluorescencia verde superior al fondo para las raíces transgénicas *Nt-GFP-GUS-AmhCt* y *Nt-GFP-GUS-AmhH1N*, respectivamente. Para las primeras, la emisión se visualiza predominantemente en los límites de la membrana plasmática (Figura 8B), en contraste con lo observado en raíces *AmhH1N* donde además, se observa distribuido mayoritariamente en el interior celular (Figura 8C). Al analizar las imágenes obtenidas de ambos tipos de raíces transgénicas preincubadas con el colorante Rojo Neutro (RN), se puede apreciar que la fluorescencia de este co-localiza con la emitida por la construcción *GFP-GUS-AmhH1N* en el interior celular (Figura 8E), no así en raíces con la señal Cterminal de la amarantina que presenta co-localización parcial en el interior, aunque se mantiene diferencialmente verde en los límites celulares y con una marcada intensidad en los haces vasculares (Figura 8D).

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que indistintamente de la señal de amarantina fusionada a GFP su expresión en raíces de *N. tabacum* transgénicas es estable. Por su distribución mayoritaria en los límites de la membrana plasmática podríamos deducir que al utilizar la señal de direccionamiento *AmhCt* la proteína recombinante se localiza principalmente en vacuolas de reserva o PSV en raíz de tabaco. Asimismo, Flückiger *et al.* (2003), muestran un patrón similar con la expresión de GFP-Chi de Di Sansebastiano *et al.* (1998; 2001) en meristema radicular de *Arabidopsis* cv. Wassylevskaja, la cual se localizó mayoritariamente en PSV (Figura 9A), pero a menudo en vacuola central (Figura 9C). Esta localización ocasional en la vacuola central explicaría la colocación parcial de *GFP-GUS-AmhCt* con la fluorescencia del colorante RN. Por el contrario, la construcción *GFP-GUS-AmhH1N* se localiza predominantemente en vacuolas de tipo ácidas en este órgano, lo que se pudo corroborar al colocalizar con el colorante RN. Sin embargo, en el patrón de fluorescencia característico de vacuolas líticas (Figura 9B) no se observa marca sobre el límite celular, por lo que podría suponerse que *GFP-GUS-AmhH1N* se encuentra además en la vacuola central. Esto último, estaría de acuerdo con el modelo observado en células maduras, donde las vacuolas líticas, así como PSV, se fusionan en un compartimiento simple como la vacuola central (Vitale *and* Raikhel, 1999).

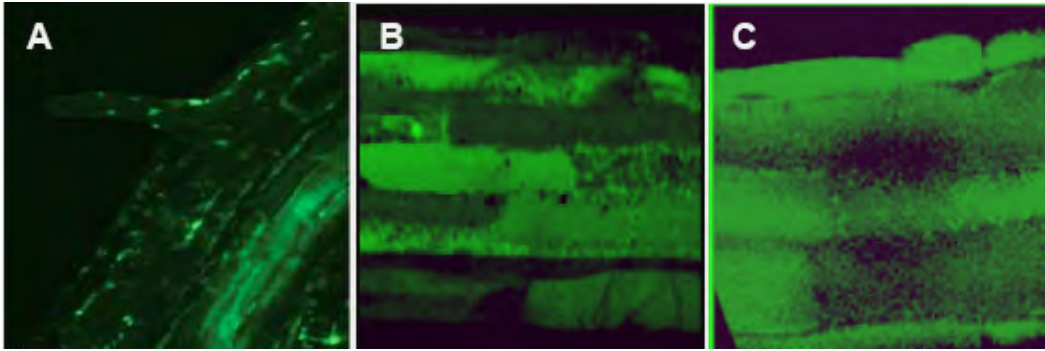


Figura 9: Patrón de fluorescencia GFP en vacuolas de raíces de *Arabidopsis*. En A) expresión de GFP fusionada a la señal de direccionamiento de la quitinasa A de tabaco (GFP-Chi) como marcador de PSV (Di Sansebastiano y col.1998; 2001), en B) fluorescencia de GFP en Vacuolas Líticas (LV) al utilizar Aleu-GFP (Di Sansebastiano y col., 2001). El reportero fluorescente Aleu-GFP marca a menudo la Vacuola Central en raíces de *Arabidopsis* cv. Wassylevskaja (C). La imagen (A) es tomada de Brandizzi et al. (2004) pág.: 143 y, las imágenes (B) y (C) son adaptadas de Flückiger et al.(2003) pág.: 1580.

II.2.6.1.3 Localización subcelular de GFP en semillas de plantas transgénicas *Nt*-GFP-GUS-AmhCt y *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N por microscopía confocal de fluorescencia

Uno de los objetivos de obtener líneas transgénicas estable que contengan el doble reportero fusionado con las señales AmhCt y AmhH1N es poder estudiar si estas son eficientes en el direccionamiento a PSV en distintos órganos. Siendo la ruta a PSV propia de semillas y, no pudiendo extrapolarse los resultados obtenidos con hojas de plantas transgénicas, ya que en el capítulo anterior mostramos que el direccionamiento de sec-Ab y Ab-KDEL era órgano-dependiente, se realizó la observación de fluorescencia por microscopía fluorescente en cortes de semillas transgénicas maduras de *Nt*-GFP-GUS-AmhCt y *Nt*-GFP-GUS-AmhH1N (Figura 10).

Dado que la cubierta de la semilla o testa presenta en condiciones naturales marcada autofluorescencia, previo a la observación microscópica se quitó la misma por métodos físicos. Al analizar las imágenes obtenidas luego de la microscopía fluorescente, se pudo observar en el control con semillas salvajes que también presentaban autofluorescencia las células del endosperma, con el filtro para fluorescencia verde, así como para la roja (Figura 10A). En los cortes de semillas transgénicas maduras *Nt*-GFP-GUS-AmhCt y AmhH1N (Figura 10B y C, respectivamente), si bien la fluorescencia verde, a diferencia del control, se muestra de manera definida marcando el interior en células del endosperma (Figura 10 B y C; v), la

misma colocaliza parcialmente con la fluorescencia roja (Figura 10 B y C; svr) presentando además intensidad levemente mayor a la emitida por el control (Figura 10A).

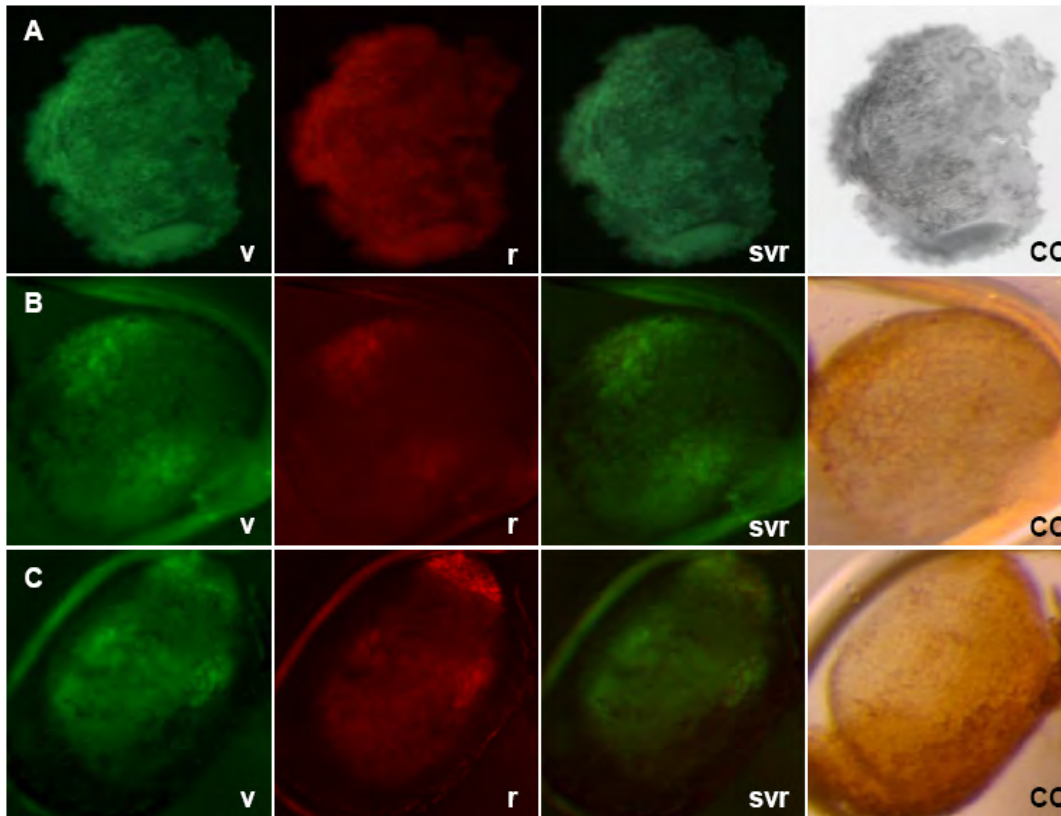


Figura 10: Microscopía de fluorescencia en semillas transgénicas en (B) *Nt*-GG- Amh-Ct y en (C) para la señal AmhH1N. Como control negativo se utilizó semillas *Nt* salvaje (A). (v) indica fluorescencia verde, (r) rojo, (svr) superposición (verde, rojo) y (CC) representa la imagen tomada en campo claro.

En secciones anteriores, se determinó que las semillas obtenidas en la generación F_0 son transgénicas debido a que germinaron y dieron plantas que fueron seleccionadas en medio conteniendo el agente selector y además, al analizar cortes en hojas y raíces de estas mismas plantas transgénicas, se observó expresión estable del transgen tanto por fluorescencia así como por medida de actividad β -glucuronidasa; no obstante, con los resultados obtenidos aquí no se puede confirmar que las construcciones GFP-GUS-AmhCt o GFP-GUS-AmhH1N se expresen de manera estable en semillas transgénicas, así como tampoco, deducir la localización subcelular en este órgano, debido principalmente a la marcada autofluorescencia observada. Estudios realizados con embriones maduros o cerca de la maduración de arabis, demuestran que el espectro de emisión de fluorescencia de estos al ser excitado a 405nm, revela un pico de autofluorescencia característico a 500nm, el cual se atribuye

principalmente a PSV (Li *et al.*, 2006). Esta propiedad es utilizada en la actualidad para identificar el lumen de PSV, permitiendo una detección simultanea de otros fluoróforos que emiten especialmente en longitudes de onda lejanas, como RFP o YFP (del inglés: *Yellow Fluorescent Protein*) (Hunter *et al.*, 2007); sin embargo, no puede ser utilizada con el reportero GFP ya que su espectro de excitación (395-455nm) y emisión (485-525nm) se superpone con el de esta organela, como puede observarse en la Figura 10. Sin embargo, la aplicación de técnicas más avanzadas, como inmunomicroscopía electrónica (IM), podrían responder adecuadamente sobre la localización de las construcciones estudiadas en semillas.

I.3 Discusión

Al inicio de este trabajo la información disponible acerca de señales de direccionamiento de proteínas de reserva era escasa y el modelo más aceptado era que la agregación actuaba en si misma como señal. En el desarrollo de este trabajo se pudo observar una gran dificultad para obtener plantas transgénicas de *N. tabacum* con GFP vacuolar, debido posiblemente a la alteración de la organogénesis de la planta. Las vacuolas muestran diferentes características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas en distintas especies de plantas y estas están sujetas a varias modificaciones durante el crecimiento y la diferenciación celular. Considerando entonces sus funciones en la planta, la sobreexpresión de proteínas exógenas vacuolares podría afectar la correcta organización del conjunto vacuolar indispensable para la actividad celular. De hecho, mutantes *knockout* de *A. thaliana* con morfología vacuolar alterada (*vacuoleless vcl1*) demostraron no ser viables (Rojo *et al.*, 2001). Es plausible especular entonces que la vacuola saturada con GFP tiene un efecto negativo en el crecimiento celular de *Nicotiana* pero no de *Arabidopsis* como publicase Di Sansebastiano *et al.* (2007). Esto podría explicar la baja eficiencia de regeneración de plantas transgénicas con las construcciones utilizadas GFP-GUS-AmhCt y GFP-GUS-AmhH1N. Quizá la expresión de estas construcciones doble reportero bajo un promotor inducible podría enmendar los problemas de regeneración aunque, no solucionaría la falta o baja fluorescencia en compartimientos vacuolares. De hecho, las mismas construcciones utilizadas en ensayos de expresión transitoria por agroinfiltración, no mostraron fluorescencia de GFP en vacuolas y sólo se observó un patrón típico de retículo endoplásmico.

No obstante, se obtuvieron plantas transgénicas (expresión estable) con una construcción reportera GFP-GUS fusionada con las señales AmhCt (KISIA) o AmhH1N (NIFRGF) sugeridas como señal a PSV y a vacuolas tipo lítica respectivamente. El obtener estas plantas proveyó un sistema que permitió evaluar adecuadamente el direccionamiento tanto en hojas como en raíces. Asimismo, se fijó que la incubación de plantas transgénicas de tabaco durante 48 horas en oscuridad, previo a la observación de fluorescencia, evita la pérdida de emisión como fuera publicado para *Arabidopsis*. (Tamura *et al.*, 2003). A pesar de esta variabilidad en los niveles de fluorescencia, causado por el efecto de degradación dependiente de la luz, los

patrones de localización presentan validez como fuera demostrado en trabajos previos por Di Sansebastiano *et al.*, (2007). Igualmente, es probable que vacuolas de diferentes especies vegetales, no manifiesten las mismas condiciones permisivas en la fluorescencia del reportero GFP.

Se determinó además, que la señal C-terminal KISIA y hélice H1N de la globulina 11S de amaranto, al fusionarse con una construcción de gran tamaño, como GFP-GUS, son igualmente capaz de dirigir y localizar a la proteína recombinante en vacuolas en una suspensión de protoplastos y, en distintos órganos de plantas transgénicas de *N tabacum*. En contraste, el tetrapéptido IAGF que es parte del VSS de la albumina 2S de la nuez de brasil, no fue suficiente para evitar la secreción (Dombrowski *et al.*, 1993), a pesar de la similitud con el CtVSS de la faseolina de arveja (AFVY), que se sabe suficiente para el direccionamiento a vacuolas (Frigerio *et al.*, 1998, 2001). Para explicar esta diferencia ha sido propuesto que el tamaño del reportero utilizado es crítico para la señal de direccionamiento vacuolar y que unos pocos residuos de aminoácidos del mismo también podrían ser parte de la señal reconocida por el receptor (Frigerio *et al.*, 2001). Sin embargo, el CtVSS y el determinante interno H1N de la amarantina estudiados aquí, fueron suficientes para un correcto direccionamiento vacuolar; por lo tanto, el tamaño de la proteína recombinante no modificaría el direccionamiento, pudiéndose atribuir estas diferencias principalmente a la importancia que representa la composición y longitud de la secuencia del *linker* utilizada entre el reportero y el VSS, la cual favorece la exposición de la señal para ser reconocida por el receptor, como fuera también demostrado para la señal de retención/recuperación en retículo (KDEL) en el capítulo anterior.

Con la obtención de plantas transgénicas, se pudo además identificar el tipo vacuolar en distintos órganos. Siendo GFP-GUS-AmhCt localizado en vacuolas de tipo neutras, predominantemente en PSV en hojas de tabaco, ya que la misma presentó un patrón propio de estas organelas, con una distribución de fluorescencia definido en el límite de la membrana plasmática y por no presentar colocalización al co-expresar un marcador de vacuolas líticas como mCherry- γ -TIP (Nebenfuhr *et al.*, 2007); asimismo, la distribución de fluorescencia obtenida fue similar a lo reportado por Di Sansebastiano *et al.* (2001) para la expresión de GFP-Chi o, con la expresión de spRFP-AFVY (CtVSS de la faseolina de arveja) (Hunter *et al.*, 2007), ambos de localización en PSV en hojas

de tabaco. En cambio, al analizar esta señal en raíces de plantas transgénicas, si bien se obtuvo un patrón de actividad β -glucuronidasa y de fluorescencia propio de PSV, este último similar al obtenido con la construcción antes mencionada de Di Sansebastiano et al. (1998, 2001) GFP-Chi, pero en raíces (Flückiger *et al.*, 2003), la colocalización parcial con el colorante rojo Neutro (RN), supondría una ubicación ocasional de GFP-GUS-AmhCt en la vacuola central de este órgano. Esta localización dual en vacuolas podría explicarse con lo observado en células maduras de plantas, donde las vacuolas líticas y PSV se fusionan dentro de un compartimiento único como la vacuola central, capaz de recibir tanto las proteasas transportadas en vesículas cubiertas de clatrina, como las de reserva transportadas por vesículas densas (Vitale *and* Raikhel, 1999).

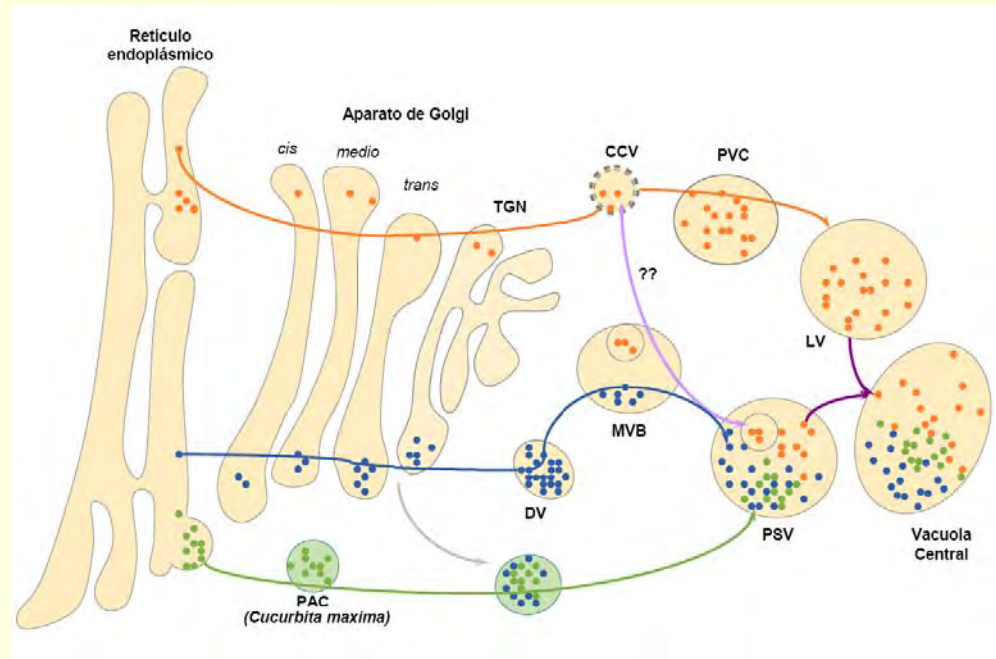
Por otro lado, la secuencia NIFRGF del determinante interno (H1N) de la amarantina, localizó el doble reportero en vacuolas líticas y vacuola central tanto en la epidermis de hojas como en las células de la punta radicular de tabaco. Los patrones de fluorescencia obtenidos son propios de una localización en vacuolas líticas, presentando fluorescencia en los límites celulares con pequeñas puntos esféricos, concordantes con lo observado para la fusión de la proteína intrínseca de tonoplasto gamma, de localización en vacuolas líticas, (γ -TIP-GFP; Saito *et al.*, 2002) y mCherry- γ -TIP (Nebenfuhr *et al.*, 2007). También se pudo observar que el reportero verde fluorescente se expresa de manera inestable en el lumen de dichas vacuolas en hojas, probablemente debido al pH del mismo, alterando este el equilibrio de protonación provocando entonces la disminución o pérdida de la fluorescencia; en contraste el fluoróforo rojo que se expresó de manera estable marcando correctamente el lumen vacuolar, siendo más adecuado para la identificación de vacuolas de naturaleza ácida (Samalova *et al.*, 2006). Por otro lado, al analizar el comportamiento de la secuencia NIFRGF fusionada al doble reportero en raíz, se pudo determinar que también localiza la proteína recombinante en vacuolas de tipo ácidas, tanto por la coloración azul en los límites celulares al incubar con el sustrato específico de la β -glucuronidasa, como por la colocalización de fluorescencia con el colorante RN de tinción específica en estas organelas.

Teniendo en cuenta lo visto en ambas secciones, podemos decir que en *Nicotiana tabacum*, el direccionamiento a vacuolas al utilizar VSSs específicos de estas se manifiesta no muestra un comportamiento órgano dependiente, como también fuera

publicado para *M. truncátula* con la expresión de una fitasa secretoria recombinante que fue correctamente localizada en el apoplasto (Abranches *et al.*, 2008), mostrando que dicha especialización del direccionamiento de proteínas en tejidos de reserva es un fenómeno especie-dependiente; asimismo se pudo observar principalmente en raíces, que la localización final de proteínas de reserva o líticas, en células maduras, es la vacuola central, dado por la fusión de ambas vacuolas.

II.4 Conclusiones

- ✦ La secuencia KISIA (AmhCt) o NIFRGGF (AmhH1N) son suficiente para dirigir proteínas recombinantes a vacuolas en *N. tabacum*.
- ✦ El direccionamiento es independiente del tamaño de la proteína, no así para el *linker* utilizado.
- ✦ La señal AmhCt dirige predominantemente a PSV, mientras que el determinante interno AmhH1N a Vacuolas Líticas.
- ✦ El direccionamiento de las proteínas reporteras fusionadas a estas señales en hojas y raíces es órgano-independiente en tabaco.
- ✦ El reportero GFP se expresa de manera inestable en el lumen de vacuolas líticas.
- ✦ La autofluorescencia de PSV en semillas hace inadecuado el uso del reportero verde para la identificación de vacuolas en dicho órgano.



DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Los progresos en ingeniería genética de plantas han abierto una nueva oportunidad para utilizar las mismas como biorreactores para la producción de biomoléculas. Así, varios ejemplos de proteínas recombinantes de interés industrial o farmacéutico se producen actualmente en distintos tipos de órganos de plantas demostrando su gran potencial. No obstante, la experiencia ganada en la expresión de proteínas recombinantes en plantas, demuestra que aún queda por resolver los problemas de bajos niveles de acumulación, de localización subcelular (importante para lograr las modificaciones postraduccionales requeridas) y la degradación proteolítica. En este sentido, como se citó en secciones anteriores, se han utilizado diferentes estrategias, siendo una de ellas, la expresión de la proteína de interés en compartimientos de reservas como PSV, particularmente en semillas.

En este trabajo, la utilización de la señal de retención en ER (KDEL), fusionada al COOH-terminal de una inmunoglobulina IgG1, mostró incrementos en los niveles de acumulación en hojas y, aún mayor en semillas. Los estudios de localización subcelular y glicosilación realizados, tanto en hojas como en semillas permitieron además evaluar otros aspectos del problema que han sido escasamente estudiados por otros investigadores. Por otro lado, el trabajo incluyó el uso de un mAb en una versión secretoria (sec-Ab) lo que permite además descartar hipótesis de presencia de señales de direccionamiento que se manifiestan sólo en células vegetales como ha sido informado para inmunoglobulinas híbridas tipo G y A donde se observó la presencia de un determinante de direccionamiento vacuolar no descrito en células plasmáticas (Hadlington *et al.*, 2003). El estudio de la localización subcelular del Ab-KDEL en semilla, probó que éste se encuentra mayoritariamente en PSV, no así en hojas donde es tanto eficientemente retenido en el ER como recuperado del *cis*-GA. Esto sugiere que esta señal de direccionamiento tiene un efecto que es órgano-dependiente. Una posible explicación, teniendo en cuenta que esta señal sigue las reglas para CtVSS, es que sería reconocida por un receptor de direccionamiento vacuolar específico de semillas en desarrollo. También ha sido sugerido que la secuencia COOH-terminal KDEL, sea reconocida en condiciones transgénicas como un determinante CtVSS en semillas, no

así en las proteínas nativas de la planta (Boothe *et al.*, 2010). Sin embargo también debe considerarse la presencia de vesículas KDEL que transportan proteasas a vacuolas de reserva en *mungbean* (Okamoto *et al.*, 2003). Un resultado llamativo fue que sec-Ab también se localizó mayoritariamente en PSV en semillas mientras que en hojas los resultados de glicosilación sugieren su secreción. Es claro, que este inusual direccionamiento, tanto de Ab-KDEL como de sec-Ab, en semilla se relacionaría con la competencia entre la secreción y el direccionamiento a vacuolas de reserva, estando esta última vía mucho más desarrollada en semillas en desarrollo donde es crucial lograr la acumulación de reservas de nitrógeno y carbono para la germinación. Este no es un fenómeno aislado de semillas de tabaco, sino que también ha sido informado tanto para semillas de monocotiledóneas como dicotiledóneas (Nicholson *et al.*, 2005; Vitale, 2005), y también fue demostrado en proteínas recombinantes expresadas en levaduras (Robinson, 2005). A diferencia de los resultados presentados en este trabajo, Abranches y colaboradores (2008) demuestran que en *M. truncátula* esta órgano-dependencia no existe, ya que la expresión de una fitasa fusionada con la señal KDEL, fue correctamente retenida en ER de ambos órganos, aunque el trabajo aclara que esta especialización podría estar sujeta a la especie de planta analizada.

Desde el punto de vista práctico, una heterogénea localización subcelular, podría resultar en la heterogeneidad y/o recuperación reducida del producto final, lo que representaría un problema para la producción industrial en grandes cantidades. También se debe considerar que las condiciones de cultivo de las plantas de tabaco afectan la glicosilación de anticuerpos producidos (Stevens *et al.*, 2000; Elbers *et al.*, 2001), siendo este problema también habitual en la producción de mAb en líneas celulares de mamíferos, y que determina que la actividad específica de producto final sea baja y además, variable de una partida a otra de productos (Satoh *et al.*, 2006). En este sentido, el utilizar señales de direccionamiento vacuolar (KISIA y/o NIFRGF) identificadas y caracterizadas en este trabajo, que poseen la característica de no mostrar órgano dependencia, podrían permitir obtener un producto más homogéneo. Sin embargo, como vimos en secciones anteriores, el principal problema al utilizar estos CtVSS, fusionados al doble reportero GFP-GUS, fue la alteración de la organogénesis de la planta, lo que se reflejó en la muy baja tasa de regeneración de plantas transgénicas. Del mismo modo, Di Sansebastiano y colaboradores (2007) informa el mismo problema al expresar en tabaco GFP fusionado con el CtVSS de la quitinasa A, no así en *Arabidopsis* cv.

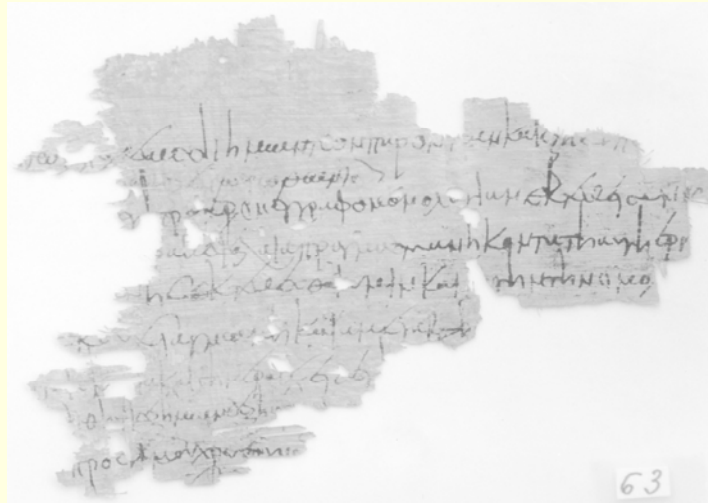
Wassilewskaja. No obstante, la expresión de diferentes proteínas recombinantes con distintos determinantes de direccionamiento vacuolar, como RFP fusionado con CtVSS de la faseolina o, YFP (*yellow fluorescent protein*), no presentaron este inconveniente (Hunter *et al.*, 2007); por lo que las diferencias morfológicas o de desarrollo encontradas al utilizar VSS en proteínas recombinantes, se podría atribuir no solo a propiedades intrínsecas de la construcción utilizada (Frigerio *et al.*, 2001; Zhen *et al.*, 2004), sino además a la especie de planta en estudio. Asimismo, la utilización de GFP como marcador de vacuolas en plantas, demuestra importantes desventajas ya que, se observa una fuerte dependencia del entorno vacuolar, como el pH o la luz (Tamura *et al.*, 2003; Fluckiger *et al.*, 2003). Por lo tanto, los resultados obtenidos aquí al utilizar los determinantes de direccionamiento de la amarantina con la construcción GFP-GUS, no podrían extenderse a otras proteínas de interés, siendo necesaria una caracterización más exhaustiva de estas señales.

Recientemente el dominio Nterminal -zeína, derivado de la proteína de reserva zeolina de maíz, ha sido utilizado con éxito para la producción de algunas proteínas de interés en hojas (Mainieri *et al.*, 2004; de Virgilio *et al.*, 2008; Bellucci *et al.*, 2007; Torrent *et al.*, 2009; Torrent *et al.*, 2009). En este caso, se utilizó una secuencia más larga que además de determinar el lugar de acumulación induce en hojas la formación de estructuras similares a los PB encontrados en semillas de cereales. La proteína de interés queda de esta manera retenida en el ER, por lo que si tiene sitios de glicosilación los mismos quedarán como Man 8 y Man 7, lo que es un problema ya que es muy difícil que esta estructura pueda “humanizarse”. Otra estrategia que también induce la formación de estructuras no habituales es la fusión de la proteína de interés a ELP (*elastin like proteins*) que tiene un efecto positivo en cuanto al incremento de los niveles de acumulación y a la posibilidad de recuperación de la proteína de interés (Floss *et al.*, 2010; Floss *et al.*, 2009), pero tampoco permitiría producir proteínas que requieran una glicosilación similar a la de mamíferos. Con relación a la producción de glicoproteínas, los resultados más importantes en plantas se han dado en *Lemna minor*, donde el uso de RNA de interferencia ha permitido evitar la adición de glicanos complejos típicos de plantas (Cox *et al.*, 2006). Sin embargo, faltaría considerar la adición de galactosa y ácido siálico al glicano biantenarico producido. La introducción de una alpha 1-4 galactosil transferasa humana en plantas ha permitido producir glicoproteínas con la galactosa alpha 1-4 unida en ambos brazos del glicano biantenarico (Bakker *et al.*, 2001;

Fujiyama *et al.*, 2007; Bakker *et al.*, 2006). La incapacidad de las células vegetales de sintetizar el ácido siálico N-Acetil-Neuramínico (NANA) es difícil de superar, aunque es de destacar que las líneas celulares actualmente empleadas para expresar glicoproteínas también poseen esta deficiencia, ya que a lo sumo introducen el ácido siálico N-GlicosilNeuramínico (NGNA) (Raju *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta, que estas últimas modificaciones son importantes para lograr que la vida media en sangre de glicoproteína terapéutica sea lo suficientemente larga para producir los efectos deseados, se ha sugerido que esta modificación en células vegetales podría reemplazarse por la adición de ácido glucurónico a través de la introducción en la misma de beta 1-3 glucurónico transferasa. Independientemente de las modificaciones que se introduzcan por glicoingeniería, es importante destacar que esta estrategia debe combinarse con una que permita lograr niveles de acumulación altos que no consistan en retener en el ER, por lo que el uso de secuencias KDEL, fusiones al dominio Nterminal -zeína y ELP no resultan adecuadas. Por estos motivos, el profundizar en el futuro si el uso de las secuencias KISIA y/o NIFRGF, caracterizadas en este trabajo, es adecuado para incrementar los niveles de acumulación generando una proteína que haya alcanzado al menos el GA medio es de interés.

PERSPECTIVAS

Se plantea continuar los estudios fusionando las secuencias KISIA y NIFRGF al extremo COOH terminal de la cadena pesada del mAb 14D9 a fin de evaluar tanto el impacto en la acumulación, glicosilación y el direccionamiento del mAb y como así también en la regeneración de plantas transgénicas.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abael, S. and Theologis, A.** (1998) Transient gene expression in protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. In *Methods in Molecular Biology: Arabidopsis Protocols*. (Salinas, J.M.M.-Z.a.J. ed: Humana, pp. 209-217.
- Abranches, R.; Arcalis, E.; Marcel, S.; Altmann, F.; Ribeiro-Pedro, M.; Rodriguez, J. and Stoger, E.** (2008) Functional specialization of *Medicago truncatula* leaves and seeds does not affect the subcellular localization of a recombinant protein. *Planta* **227**: 649-658.
- Ahmed S.U., Rojo E., Kovaleva V., Venkataraman S., Dombrowski J.E., Matsuoka K., Raikhel, N.V.,** (2000). The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH₂-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in *Arabidopsis thaliana*, *J. Cell Biol.* **149**: 1335-1344.
- Alberts** (2008) *Molecular Biology Of The Cell*. 4th Edition.
- Alvarez ML, Pinyerd HL, Crisantes JD, Rigano MM, Pinkhasov J, Walmsley AM,** (2006) Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice. *Vaccine*; **24**:2477–2490.
- Arakawa T, Chong DKX, Langridge WHR.** (1998) Efficacy of a food plant-based cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol*; **16**:292–297.
- Arakawa T, Chong DKX, Merritt JL, Langridge WHR.** (1997) Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res*; **6**:403–413.
- Arakawa T, Yu J, Langridge WH.** 2001 Synthesis of a cholera toxin B subunit-rotavirus NSP4 fusion protein in potato. *Plant Cell Rep*; **20**:343–8.
- Arango IP, Rubio EL, Anaya ER, Flores TO, de la Vara LG, Lim MAG.** (2008) Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high-levels and evaluation of immune responses in mice. *Plant Cell Rep*; **27**:677–685.
- Arcalis, E., Marcel, S., Altmann, F., Kolarich, D., Drakakaki, G., Fischer, R., Christou, P. and Stoger, E.** (2004) Unexpected Deposition Patterns of Recombinant Proteins in Post-Endoplasmic Reticulum Compartments of Wheat Endosperm. *Plant Physiology*, **136**, 3457-3466.
- Arlen PA, Singleton M, Adamovicz JJ, Ding Y, Davoodi-Semiromi A, Daniell H.** (2008) Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts. *Infect Immun*; **76**:3640–3650.

- Ashraf S, Singh PK, Yadav DK, Shahnawaz M, Mishra S, Sawant SV**, (2005). High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *J Biotechnol*; **119**:1-14.
- Austin , S. , Bingham , E.T. , Koegel , R.G. , Mathews , D.E. , Shahan , M.N. , Straub , R.J. , and Burgess , R.R.** (1994) An overview of a feasibility study for the production of industrial enzymes in transgenic alfalfa . *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **721**: 234 – 244.
- Axelos, M., Curie, C., Mazzolimi, L., Bardet, C. and Lescure, B.** (1992) A protocol for transient gen expression in Arabidopsis thaliana protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, **30**, 123-128.
- Badri, M.A., Rivard, D., Coenen, K., and Michaud, D.** (2007). Unintended molecular interactions in transgenic plants expressing clinically-useful proteins - The case of bovine aprotinin traveling the potato leaf cell secretory pathway. *Proteomics* . **119**:1-14.
- Bakker, H.; Bardor, M.; Molthoff, J.W.; Gomord, V.; Elbers, I.; Stevens, L.H.; Jordi, W.; Lommen, A.; Faye, L.; Lerouge, P. and Bosch, D.** (2001). Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 2899–2904.
- Bakker, H., Rouwendal, G.J.A., Karnoup, A.S., Florack, D.E.A., Stoopen, G.M., Helsper, J.P.F.G., Van Ree, R., Van Die, I. and Bosch, D.** (2006) An antibody produced in tobacco expressing a hybrid β -1,4- galactosyltransferase is essentially devoid of plant carbohydrate epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 7577-7582.
- Bardor, M., Faveeuw, C., Fitchette, A.-C., Gilbert, D., Galas, L., Trottein, F., Faye, L. and Lerouge, P.** (2003) Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core {alpha}(1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology*, **13**, 427-434.
- Barta A., Sommergruber K., Thompson D., Hartmuth K., Matzke M., Matzke A.** (1986). The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol* **6**:347-357.
- Batard , Y. , Hehn , A. , Nedelkina , S. , Schalk , M. , Pallett , K. , Schaller , H. , and Werck-Reichhart , D.** (2000) Increasing expression of P450 and P450-reductase proteins from monocots in heterologous systems . *Arch.Biochem. Biophys.* **379**;161–169.
- Beachy, R.N., Petruccelli, S. and Dai, S.** (2007) RF2A AND RF2B TRANSCRIPTION FACTORS. *United States Patent* 7276370.
- Belanger FC, Kriz AL.** (1991) Molecular basis for allelic polymorphism of the maize globulin-gene. *Genetics*; **129**:863–872.
- Bellucci, M, De Marchis, F, Nicoletti, I and Arcioni, S** (2007). "Zeolin is a recombinant storage protein with different solubility and stability properties according to its

- localization in the endoplasmic reticulum or in the chloroplast." *Journal of Biotechnology* **131**(2): 97-105.
- Benchabane, M, Goulet, C, Rivard, D, Faye, L, Gomord, V and Michaud, D** (2008). "Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories." *Plant Biotechnology Journal* **6**(7): 633-648.
- Benfey, P.N., Ren, L. and Chua, N.H.** (1990) Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO Journal*, **9**, 1677-1684.
- Bethke, P. and Jones, R.L.** (2000) Vacuoles and prevacuolar compartments. *Current Opinion in Plant Biology.*, **3**, 469-475.
- Bethke, P.C., Swanson, S.J., Hillmer, S. and Jones, R.L.** (1998) From Storage Compartment to Lytic Organelle: The Metamorphosis of the Aleurone Protein Storage Vacuole. *Ann. Bot.*, **82**, 399-412.
- Bhat SR, Srinivasan S.** (2002) Molecular and genetic analyses of transgenic plants: considerations and approaches. *Plant Sci*; **163**:673–681.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Boehm, R.** (2007) Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 121-134.
- Bollini R., Vitale A., Chrispeels MJ.** (1983). In vivo and in vitro processing of seed reserve protein in the endoplasmic reticulum: evidence for two glycosylation steps. *J Cell Biol* **96**:999-1007.
- Boothe, J., Nykiforuk, C., Shen, Y., Zaplachinski, S., Szarka, S., Kuhlman, P., Murray, E., Morck, D. and Moloney, M.M.** (2010) Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnol J*, **8**, 588-606.
- Boston, R.S., Viitanen, P.V. and Vierling, E.** (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, **32**, 191-222.
- Boyer SK., Shotwell MA., Larkins BA.** (1992). Evidence for the translational control of storage protein gene expression in oat seeds. *J Biol Chem* **267**:17449-17457.
- Brandizzi, F., Irons, S., Johansen, J., Kotzer, A. and Neumann, U.** (2004) GFP is the way to glow: bioimaging of the plant endomembrane system. *J Microsc*, **214**, 138-158.
- Burton, D. R.** (2001) Antibody libraries. In: Phage Display: A Laboratory Manual. Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. S. (eds). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. pp: 3-18.
- Bustos MM., Kalkan FA., van den Bosh KA., Hall T.** (1991). Differential accumulation of four phaseolin glycoforms in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* **16**:381-395.

- Butaye KM, Goderis IJ, Wouters PF, Pues JM, Delaure SL, Broekaert WF**, (2004). Stable highlevel transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. *Plant J*; **39**:440–449.
- Carrington, D.D. Freed, A.J. Leinicke**, (1991) Bipartite signal sequence mediates nuclear translocation of the plant polyviral N1a protein. *Plant Cell* **3**:953-962.
- Carter, P.** (2001) Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature Reviews Cancer* **1**:118-129.
- Castañón S, Marín MS, Martín-Alonso JM, Boga JA, Casais R, Humara JM Ordás RJ**, (1999). Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol*; **73**: 4452–4455.
- Castañón S, Martín-Alonso JM, Marín MS, Boga JA, Alonso P, Parra F**, (2002). The effect of the promoter on expression of VP60 gene from rabbit hemorrhagic disease virus in potato plants. *Plant Sci*; **162**:87–95.
- Castelli, S. and Vitale, A.** (2005) The phaseolin vacuolar sorting signal promotes transient, strong membrane association and aggregation of the bean storage protein in transgenic tobacco. *J. Exp. Bot.*, **56**, 1379-1387.
- Ceriotti A., Duranti M., Bollini R.** (1998). Effects of N-glycosylation on the folding and structure of plant proteins. *J Exp Bot* **49(324)**:1091-1103.
- Chargelegue D., Vine ND., van Dolleweerd CJ., Drake PM., Ma JK.** (2000). A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice. *Transgenic Res* **9**:187-194.
- Chen TL, Lin YL, Lee YL, Yang NS, Chan MT.** (2004) Expression of bioactive human interferongamma in transgenic rice cell suspension cultures. *Transgenic Res*; **13**:499–510.
- Chrispeels, M.J. and Faye, L.** (1996) A production system for industrial and pharmaceutical proteins. In *Transgenic Plants* (Owen, MRL and Pen, J., eds), pp. 99–113. London: Wiley.
- Conley, AJ, Joensuu, JJ, Jevnikar, AM, Menassa, R and Brandle, JE** (2009). "Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants." *Biotechnology and Bioengineering* **103(3)**: 562-573.
- Conrad, U. and Fiedler, U.** (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol. Biol.*, **38**, 101-109.
- Cordewener J., Booij H., van der Zandt H., van Engelen F., van Kammen A., de Vries S.** (1991). Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by selected cationic peroxidase isoenzymes. *Planta* **184**:478-486.

- Cox, K.M., Sterling, J.D., Regan, J.T., Gasdaska, J.R., Frantz, K.K., Peele, C.G., Black, A., Passmore, D., Moldovan-Loomis, C., Srinivasan, M., Cuison, S., Cardarelli, P.M. and Dickey, L.F.** (2006) Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nature Biotechnology*, **24**, 1591-1597.
- Craddock, C.P., Hunter, P.R., Szakacs, E., Hinz, G., Robinson, D.G. and Frigerio, L.** (2008) Lack of a vacuolar sorting receptor leads to non-specific missorting of soluble vacuolar proteins in arabidopsis seeds. *Traffic*: **9**, 408-416.
- Cramer CL, Weissenborn DL, Oishi KK, Grabau EA, Bennett S, Ponce E,**(1996) Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann N Y Acad Sci* ;**792**:62–71.
- Crofts AJ, Leborgne-Castel N, Hillmer S, Robinson DG, Phillipson B,** Carlsson LE, Ashford DA, Denecke J (1999) Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde bulk Xow. *Plant Cell*; **11**:2233–2248
- Curry C., Gilkes N., O'Neill G., Miller C., Skipper N.** (1988). Expression and secretion of a *Cellulomonas fimi* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **54**:476-484.
- Curtiss, R.I., Cardineau, C.A.** (1990) ORAL IMMUNISATION BY TRANSGENIC PLANTS, World Patent Application; 90/02484. Patent record available from the *World Intellectual Property Organization (WIPO)*.
- D'Amico L., Valsasina B., Daminati MG., Fabbrini MS., Nitti G., Bollini R., Ceriotti A., Vitale A.** (1992). Bean homologues of the mammalian glucose-regulated proteins: induction by tunicamycin and interaction with newly-synthesized seed storage proteins in the endoplasmic reticulum. *Plant J* **2**:443-455.
- Daniell, H., Streatfield, S.J. and Wycoff, K.** (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, **6**, 219-226.
- De Cosa , B. , Moar , W. , Lee , S.B. , Miller , M. , and Daniell , H.** (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals . *Nat. Biotechnol.***19**: 71–74.
- De Jaeger, G., Scheffer, S., Jacobs, A., Zambre, M., Zobell, O., Goossens, A., Depicker, A. and Angenon, G.** (2002) Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat Biotechnol*, **20**, 1265-1268.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hicks, J. B.** (1983). A plant DNA miniprep: Revision II. *Plant Mol Biol Rep* **1**, 19-21.
- De Marco, A.** (2009) Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, **8**:443-455.
- Denecke, J., Botterman, J. and Deblaere, R.** (1990). Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway. *Plant Cell* **2(1)**: 51-9.

- De Virgilio M, De Marchis F, Bellucci M, Mainieri D, Rossi M, Benvenuto E, Arcioni S, Vitale A** (2008) The human immunodeficiency virus antigen Nef forms protein bodies in leaves of transgenic tobacco when fused to zeolin. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2815-2829.
- Di Sansebastiano, G.P., Gigante, R.M., Piro, C. and Dalessandro, G.** (2007) Green fluorescent proteins reveals variability in vacuoles of three plant species. *Biologia Plantarum*, **51**, 49-55.
- Di Sansebastiano, GP, Paris, N, Marc-Martin, S and Neuhaus, JM** (1998). "Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway." *Plant J* **15(4)**: 449-57.
- Di Sansebastiano, G.P., Paris, N., Marc-Martin, S. and Neuhaus, J.-M.** (2001) Regeneration of a Lytic Central Vacuole and of Neutral Peripheral Vacuoles Can Be Visualized by Green Fluorescent Proteins Targeted to Either Type of Vacuoles. *Plant Physiology*, **126**, 1078-1092.
- Dombrowski, J.E., Schroeder, M.R., Bednarek, S.Y. and Raikhel, N.V.** (1993) Determination of the functional elements within the vacuolar targeting signal of barley lectin. *Plant Cell*, **5**, 587-596.
- Dong JL, Liang BG, Jin YS, Zhang WJ, Wang T** (2005). Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* ;**339**:153–163.
- Doran, P.M.** (2006) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends in Biotechnology*, **24**, 426-432.
- Drakakaki G, Marcel S, Arcalis E, Gonzalez-Melendi P, Fischer R, Christou P, Stoger E** (2006) The intracellular fate of a recombinant protein is tissue dependent. *Plant Physiol* **141**:578–586.
- Driouich A., Gonnet P., Makkie M., Laine AC., Faye L.** (1989). The role of high-mannose and complex asparagines-linked glycans in the secretion and the stability of glycoproteins. *Planta* **180**:96-104.
- Dubrovsky, JG., Saralegui, A.; Napsucialy-Mendivil, S.; Voigt, B.; Baluska F. and Menzel D.** (2006) Neutral Red as a Probe for Confocal Laser Scanning Microscopy Studies of Plant Roots. *Annals of Botany*, **97**, 1127-1138.
- Duranti M., Gius C., Sessa F., Vecchio G.** (1995). The saccharide chain of lupin seed conglutin γ is not responsible for the protection of the native protein from degradation by trypsin, but facilitates the refolding of the acid-treated protein to the resistant conformation. *Eur J Biochem* **230**:886-891.
- Durrani Z, McInerney TL, McLain L, Jones T, Bellaby T, Brennan FR,** (1998) Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide from HIV-1 gp41 stimulates better

- mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. *J Immunol Methods*; **220**:93-103.
- Dwek RA.** (1996). Glycobiology: toward understanding the function of sugars. *Chem Rev* **96**:683-687.
- Eckhardt M., Fewou SN., Ackermann I., Gieselmann V.** (2002). N-glycosylation is required for full enzymic activity of the murine galactosylceramide sulphotransferase. *Biochem J* **368**:317-324.
- Ehara M, Noguchi T, Ueda K.** 1996. Uptake of neutral red by the vacuoles of a green alga, *Micrasterias pinnatifida*. *Plant Cell Physiology* **37**: 734-741.
- Elbers, I.J.W., Stoopen, G.M., Bakker, H., Stevens, L.H., Bardor, M., Molthoff, J.W., Jordi, W.J.R.M., Bosch, D. and Lommen, A.** (2001) Influence of Growth Conditions and Developmental Stage on N-Glycan Heterogeneity of Transgenic Immunoglobulin G and Endogenous Proteins in Tobacco Leaves. *Plant Physiology*, **126**, 1314-1322.
- Faye, L. and Chrispeels, M.J.** (1985) Characterization of N-linked oligosaccharides by affino blotting with concanavalin A-peroxidase and treatment of the blots with glycosidases. *Anal Biochem*, **149**, 218-224.
- Faye, L.; Boulaflous, A.; Benchabane, M.; Gomord, V.; Michaud, D.** (2005) Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* **23**: 1770-1778.
- Faye, L. and Gomord, V.** (2010) Success stories in molecular farming ;a brief overview. *Plant Biotechnology Journal*, **8**, 525-528.
- Faye, L., Gomord, V., Fitchette-Laine, A. and Chrispeels, M.** (1993) Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing alpha 1->3 fucose or beta 1->2 xylose. *Anal Biochem*, **209**, 104-108.
- Feizi T.** (1993). Oligosaccharides that mediate cell-cell adhesion. *Curr Opin Struct Biol* **3**:701-710.
- Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espan, J., Corchero, J., Vazquez, E. and Villaverde, A.** (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*, **8**. doi:10.1186/1475-2859-8-17. <http://www.microbialcellfactories.com/content/8/1/17>.
- Filpula, D.** (2007) Antibody engineering and modification technologies. *Biomolecular Engineering*, **24**, 201-215.
- Fink A.L.** (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Review* **70**:425-449.
- Fischer, R.; Schumann, D.; Zimmermann, S.; Drossard, J.; Sack, M. and Schillberg, S.** (1999) Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *Eur. J. Biochem.* **262**: 810-817.
- Fischer, R., Twyman, R.M. and Schillberg, S.** (2003) Production of antibodies in plants and their use for global health. *Vaccine*, **21**, 820-825.

- Fischer, R. and Schillberg, S.** (2004) Plant-made Pharmaceuticals and Technical Proteins. In *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*. ISBN: 3-527-30786-9.
- Fischer U, Kuhlmann M, Pecinka A, Schmidt R, Mette MF.**(2008) Local DNA features affect RNA-directed transcriptional gene silencing and DNA methylation. *Plant J*;53:1-10.
- Fitchette AC, Cabanes-Macheteau M, Marvin L, Martin B, Satiat-Jeunemaitre B, Gomord V, Crooks K, Lerouge P, Faye L, Hawes C.** (1999). Biosynthesis and immunolocalization of Lewis a-containing N-glycans in the plant cell. *Plant Physiol* **121**:333-343.
- Fitchette-Lainé, A.C.; Gomord, V.; Cabanes, M.; Michalski, J.C.; Saint Macary, M.; Foucher, B.; Cavelier, B.; Hawes, C.; Lerouge, P. and Faye, L.** (1997). N-glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells. *Plant J.* **12**,:1411–1417.
- Floss, D.M., Schallau, K., Rose-John, S., Conrad, U. and Scheller, J.** (2010) Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends in Biotechnology*, **28**, 37-45.
- Floss, D.M., Sack, M., Arcalis, E., Stadlmann, J., Quendler, H., Rademacher, T., Stoger, E., Scheller, J., Fischer, R. and 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.
- Fluckiger, R., De Caroli, M., Piro, G., Dalessandro, G., Neuhaus, J.-M. and Di Sansebastiano, G.-P.** (2003) Vacuolar system distribution in Arabidopsis tissues, visualized using GFP fusion proteins. *J. Exp. Bot.*, **54**, 1577-1584.
- Fogher C.** (2000) A SYNTHETIC POLYNUCLEOTIDE CODING FOR HUMAN LACTOFERRIN, VECTORS, CELLS AND TRANSGENIC PLANTS CONTAINING IT.; Gene bank acc no AX006477, Patent: WO0004146.
- Foresti, O., De Marchis, F., De Virgilio, M., Klein, E.M., Arcioni, S., Bellucci, M. and Vitale, A.** (2008) Protein domains involved in assembly in the endoplasmic reticulum promote vacuolar delivery when fused to secretory GFP, indicating a protein quality control pathway for degradation in the plant vacuole. *Molecular Plant*, **1**, 1067-1076.
- Freedman RB., Hirst TR., Tuite MF.** (1989). Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci* **19**:331-336.
- Frigerio, L.; Jolliffe, N.A.; Di Cola, A.; Felipe, D.H.; Paris, N.; Neuhaus, J.M., Lord, J.M.; Ceriotti, A.; Roberts, L.M.** (2001). The internal propeptide of the ricin precursor carries a sequence-specific determinant for vacuolar sorting, *Plant Physiol.* **126**: 167-175.

- Frigerio L., MdV, Prada A., Faoro F. and Vitale A.,** (1998). Sorting of Phaseolin to the Vacuole Is Saturable and Requires a Short C-Terminal Peptide. *The Plant Cell* **10**: 1031-1042.
- Fujiyama, K., Furukawa, A., Katsura, A., Misaki, R., Omasa, T. and Seki, T.** (2007) Production of mouse monoclonal antibody with galactose-extended sugar chain by suspension cultured tobacco BY2 cells expressing human β (1,4)-galactosyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **358**, 85-91.
- Gal, S. and Raikhel, N.V.** (1994) A carboxy-terminal plant vacuolar targeting signal is not recognized by yeast. *Plant J*, **6**, 235-240.
- Galbraith DW, Zeiher CA, Harkins KR, Afonso CL.** (1992) Biosynthesis, processing and targeting of the G-protein of vesicular stomatitis virus in tobacco protoplasts. *Planta*; **186**:324–336.
- Galeffi P, Lombardia A, Di Donato M, Latinia A, Sperandea M, Cantalea C,** (2005) Expression of single-chain antibodies in transgenic plants. *Vaccine*; **23**:1823–1827.
- Garcia-Casado G., Sanchez-Monge R., Chrispeels MJ., Armentia A., Salcedo G., Gomez L.** (1996). Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. *Glycobiology* **6**:471-477.
- Gil F, Brun A, Wigdorovitz A, Catalá R, Martínez-Torrecedrada JL, Casal I,**(2001) High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. *FEBS Lett*; **488**:13–17.
- Gillikin JW., Zhang F., Coleman CE., Bass HW., Larkins BA., Boston RS.** (1997). A defective signal peptide tethers the *floury-2* zein to the endospermic reticulum membrane. *Plant Physiol* **114**:345-352.
- Goldstein , D.A. , and Thomas , J.A.** (2004) Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants . *Q. J. Med.* **97** , 705–716.
- Golovkin M, Spitsin S, Andrianov V, Smirnov Y, Xiao Y, Pogrebnyak N,** (2007). Smallpox subunit vaccine produced in planta confers protection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; **104**: 6864–6869.
- Gómez N, Carrillo C, Parra F, Salinas J, Borca MV, Escribano M.** (1998) Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology*; **249**:352–8.
- Gómez N, Wigdorovitz A, Castañón S, Gil F, Ordás R, Borca MV,** (2000) Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus. *Arch Virol*; **145**:1725–32.
- Gomord, V.; Chamberlain, P.; Jefferis, R. and Faye L.,** (2005). Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol*; (**23**): 559-565.

- Gomord, V. and Faye, L.** (2009) Recombinant Proteins from Plants: Methods and Protocols - Preface. In *Methods in Molecular Biology*.: Humana Press. DOI: 10.1007/978-1-59745-407-0.
- Gomord, V., Sourrouille, C., Fitchette, A.C., Bardor, M., Pagny, S., Lerouge, P. and Paye, L.** (2004) Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: The antibodies as a challenge. *Plant Biotechnology Journal*, **2**, 83-100.
- Gordon K., Lee E., Vitale JA., Smith AE., Westphal H., Hennighausen L.** (1987). Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Biotechnology* **5**:1183-1187.
- Goulet, C, and Michaud, D.** (2006). Dégradation and stabilization of recombinant proteins in plants. In Floriculture, ornamental and plant biotechnology, T.d. Silva, éd., *Global Science Books*, London UK, pp. 35-40.
- Grevich, J.J. and Daniell, H.** (2005) Chloroplast genetic engineering: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **24**, 83-107.
- Hadlington, J.L., Nuttall, J., Frigerio, L., Santoro, A., Vitale, A., Denecke, J. and Ma, J.K.-C.** (2003) The C-terminal extension of a hybrid immunoglobulin A/G heavy chain is responsible for its Golgi-mediated sorting to the vacuole. *Molecular Biology of the Cell*, **14**, 2592-2602.
- Hamada , A. , Yamaguchi , K.-I. , Ohnishi , N. , Harada , M. , Nikumaru , S. , and Honda , H.** (2005) High-level production of yeast (*Schwanniomyces occidentalis*) phytase in transgenic rice plants by a combination of signal sequence and codon modification of the phytase gene . *Plant Biotechnol. J.* **3** , 43 – 55 .
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ.** (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*; **268**:714–716.
- Hara-Nishimura I., Inoue K., Nishimura M.** (1991). A unique vacuolar processing enzymeresponsible for conversion of several propotein precursors into the mature forms. *FEBS Lett* **294**:89-93.
- Hara-Nishimura I., Shimada T., Hatano K., Takeuchi Y. and Nishimura M.,** (1998). Transport of Storage Proteins to Protein Storage Vacuoles Is Mediated by Large Precursor-Accumulating Vesicles *Plant Cell* **10**: 825-821.
- Hara-Nishimura I., Takeuchi Y., Nishimura M.** (1993). Molecular characterization of avacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. *Plant Cell* **5**:1651-1659.
- Hartl F.U.** (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**:571-580.
- Hassan AM., Wesson C., Trumble WR.** (1995). Calreticulin is the major Ca²⁺ storage proteinin the endoplasmic reticulum of the pea plant (*Pisum sativum*). *Plant Physiol* **221**:54-59.

- Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M.** (1999) Accumulation of a fusion protein containing 2S albumin induces novel vesicles in vegetative cells of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, **40**, 263-272.
- Hein MB, Yeo T, Wang F, Sturtevant A.** (1996) Expression of cholera toxin subunits in plants. *Ann NY Acad Sci*; **792**:50–56.
- Helenius A., Trombetta ES., Hebert DN., Simons JF.** (1997). Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol* **7**:193-200.
- Hellwig , S. , Drossard , J. , Twyman , R.M. , and Fischer , R.** (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat. Biotechnol.*; **22**:1415–1422.
- Henry S., Oriol R., Samuelson B.** (1995). Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang* **6**:166-182.
- Herman, E.M.** (2008) Endoplasmic reticulum bodies: solving the insoluble. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 672-679.
- Herman, E. and Larkins, B.A.** (1999). Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* **11**,601–614.
- Herman, E. and Schmidt, M.** (2004) Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. *Plant Physiology*, **136**, 3440-3446.
- Herman, E.; Tague, B.; Hoffman, L.; Kjemtrup, S. and Chrispeels, M.** (1990). Retention of phytohemagglutinin with carboxyterminal tetrapeptide KDEL in the nuclear envelope and the endoplasmic reticulum. *Planta*, **182**: 305–312.
- Hernandez-Garcia CM, Martinelli AP, Bouchard RA, Finer JJ.** (2009) A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean. *Plant Cell Rep*; **28**:837–834.
- Hillmer, S., Movafeghi, A., Robinson, D.G. and Hinz, G.** (2001) Vacuolar storage proteins are sorted in the cis-cisternae of the pea cotyledon Golgi apparatus. *J Cell Biol*, **152**, 41-50.
- Hinz G., Hillmer S., Bäumer M., Hohl I.,** (1999). Vacuolar storage proteins and the putative vacuolar sorting receptor BP-80 exit the Golgi apparatus of developing pea cotyledons in different transport vesicles, *Plant Cell* **11**: 1509-1524.
- Hinz G., Vitale A.,** (2005). Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *TRENDS in Plant Science*, **10**: 316-323.
- Hoffmeisterova H, Cerovska N, Moravec T, Plchova H, Folwarczna J, Veleminsky J.** (2008) Transient expression of fusion gene coding for the HPV-16 epitopes fused to the sequence of potyvirus coat protein using different means of inoculation of *Nicotiana benthamiana* and *Brassica rapa*, cv. *Rapa* plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult*; **94**: 261–267.

- Hofte, H. and Chrispeels, M.J.** (1992) Protein sorting to the vacuolar membrane. *Plant Cell*, **4**, 995-1004.
- Hoh, B., Hinz, G., Jeong, B.K. and Robinson, D.G.** (1995) Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. *J Cell Sci*, **108**, 299-310.
- Hohl I., Robinson D., Chrispeels MJ., Hinz G.** (1996). Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat. *J Cell Sci* **109**:2539-2550.
- Holkeri H., Vitale A.,** (2001). Vacuolar sorting determinants within a plant storage protein trimer act cumulatively, *Traffic* **2**: 737-741.
- Hood, E.E.** (2004) Where, oh where has my protein gone? *Trends Biotechnol*, **22**, 53-55.
- Hood EE., Kusnadi A., Nikolov Z., Howard JA.** (1999). Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize. In *Chemicals via Higher Plant Bioengineering*, Shahidi F, Kolodziejczyk P, Whitaker JR, Munguia AL, Fuller G (eds), *Plenum Press*, New York, pp.127-147.
- Horn, M.E., Woodard, S.L. and Howard, J.A.** (2004) Plant molecular farming: Systems and products. *Plant Cell Reports*, **22**, 711-720.
- Houston, N.L., Fan, C., Xiang, Q.-Y., Schulze, J.-M., Jung, R. and Boston, R.S.** (2005) Phylogenetic Analyses Identify 10 Classes of the Protein Disulfide Isomerase Family in Plants, Including Single-Domain Protein Disulfide Isomerase-Related Proteins. *Plant Physiol.*, **137**, 762-778.
- Huang L., Franklin AE., Hoffman NE.** (1993). Primary structure and characterization of an *Arabidopsis thaliana* calnexin-like protein. *J Biol Chem* **268**:6560-6566.
- Huang Z, Dry I, Webster D, Strugnell R, Wesselingh S.** (2001) Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*; **19**: 2163–2171.
- Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, Beuhner N, Arntzen CJ, Thanavala Y,**(2005) Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine*; **23**:1851–1858.
- Hull AK, Yusibov V, Mett V.** (2005) Inducible expression in plants by virus-mediated transgene activation. *Transgenic Res*; **14**:407–416.
- Hunter P.R. Craddock C.P., Di Benedetto S., Roberts L.M. and Frigerio L.,** (2007). Fluorescent Reporter Proteins for the Tonoplast and the Vacuolar Lumen Identify a Single Vacuolar Compartment in Arabidopsis Cells. *Plant Physiology* **145**: 1371-1382.
- Huo, X., Liu, Y., Wang, X., Ouyang, P., Niu, Z., Shi, Y. and Qiu, B.** (2007) Co-expression of human protein disulfide isomerase (hPDI) enhances secretion of bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, **54**, 234-239.

- Jani D, Singh NK, Bhattacharya S, Meena LS, Singh Y, Upadhyay SN**, 2004. Studies on the immunogenic potential of plant-expressed cholera toxin B subunit. *Plant Cell Rep*; **22**:471–477.
- Jefferis, R.** (2005). Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics. *Biotechnol Prog.* **21**: 11-16.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, **6**, 3901-3907.
- Jiang, L. and Rogers, J.C.** (1998) Integral Membrane Protein Sorting to Vacuoles in Plant Cells: Evidence for Two Pathways. *J. Cell Biol.*, **143**, 1183-1190.
- Jiang L., Phillips TE., Rogers SW., Roger JC.** (2000). Biogenesis of the protein storage vacuole crystalloid. *J Cell Biol* **150**:755-769.
- Jin, C., Altmann, F., Strasser, R., Mach, L., Schähs, M., Kunert, R., Rademacher, T., Glössl, J. and Steinkellner, H.** (2008) A plant-derived human monoclonal antibody induces an anti-carbohydrate immune response in rabbits. *Glycobiology*, **18**, 235-241.
- Jin, C., Bencurova, M., Borth, N., Ferko, B., Jensen-Jarolim, E., Altmann, F. and Hantusch, B.** (2006) Immunoglobulin G specifically binding plant N-glycans with high affinity could be generated in rabbits but not in mice. *Glycobiology*, **16**, 349-357.
- Johnson IS.** (1989). Human insulin from recombinant DNA technology. *Science* **219**:632-637.
- Jolliffe, N., Brown, J., Neumann, U., Vire, M., Bachi, A., Hawes, C., Ceriotti, A., Roberts, L. and Frigerio, L.** (2004) Transport of ricin and 2S albumin precursors to the storage vacuoles of *Ricinus communis* endosperm involves the Golgi and VSR-like receptors. *Plant J*, **39**, 821-833.
- Jolliffe, N., Ceriotti A., Frigerio L., Roberts L.,** (2003). The position of the proricin vacuolar targeting signal is functionally important, *Plant Mol. Biol.* **51**: 631-641.
- Jung, R., Scott, M.P., Nam, Y.W., Beaman, T.W., Bassuner, R., Saalbach, I., Muntz, K. and Nielsen, N.C.** (1998) The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins. *Plant Cell*, **10**, 343-357.
- Karasev, A.V, Foulke S, Wellens C, Rich A, Shon KJ, Zwierzynski I,** (2005). Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine*; **23**:1875–1880.
- Kawagoe, Y., Suzuki, K., Tasaki, M., Yasuda, H., Akagi, K., Katoh, E., Nishizawa, N.K., Ogawa, M. and Takaiwa, F.** (2005) The critical role of disulfide bond formation in protein sorting in the endosperm of rice. *Plant Cell*, **17**, 1141-1153.
- Kawai M, Samarajeewa PK, Barrero RA, Nishiguchi M, Uchimiya H.** 1998. Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots. *Planta* **204**: 277–287

- Kembhavi, A.A.; Buttle, D.J.; Knight, C.G.; Barrett, A.J.** (1993). The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**: 208–213.
- Khoudi, H., Laberge, S., Ferullo, J.M., Bazin, R., Darveau, A., Castonguay, Y., Allard, G., Lemieux, R., and Vezina, L.P.** (1999) Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnol. Bioeng.* **64**: 135 – 143.
- Kim H-S, Euym J-W, Kim M-S, Lee B-C, Inhee M-J, Jeon J-H,** (2003). Expression of human amyloid peptide in transgenic potato. *Plant Sci*; **165**:1445–1451.
- Kim YS, Kim BG, Kim TG, Kang TJ, Yang MS.** (2006) Expression of a cholera toxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) using *Agrobacterium*-mediated transformation system. *Plant Cell Tissue Organ Cult*; **87**:203–210.
- Kim TG, Baek MY, Lee EK, Kwon TH, Yang MS.** (2008) Expression of human growth hormone in transgenic rice cell suspension culture. *Plant Cell Rep*; **27**:885–891.
- Kirsch T., Paris N., Butler JM., Beevers L., Rogers JC.** (1994). Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:3403-3407.
- Kirsch, T., Saalbach, G., Raikhel, N.V. and Beevers, L.** (1996) Interaction of a potential vacuolar targeting receptor with amino- and carboxyl-terminal targeting determinants. *Plant Physiol*, **111**, 469-474.
- Ko, K., Tekoah, Y., Rudd, P.M., Harvey, D.J., Dwek, R.A., Spitsin, S., Hanlon, C.A., Rupprecht, C., Dietzschold, B., Golovkin, M. and Koprowski, H.** (2003). Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 8013–8018.
- Ko S, Liu JR, Yamakawa T, Matsumoto Y.** (2006) Expression of the antigen (SpaA) in transgenic hairy roots of tobacco. *Plant Mol Biol Report*; **24**:251a–g.
- Koizumi N.** (1996). Isolation and responses to stress of a gene that encodes a luminal binding protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **37**:862-865.
- Komarnytsky, S., Borisjuk, N., Yakoby, N., Garvey, A. and Raskin, I.** (2006) Cosecretion of protease inhibitor stabilizes antibodies produced by plant roots. *Plant Physiology*, **141**, 1185-1193.
- Kornfeld R. and Kornfeld S.** (1985). Assembly of asparagine-like oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**:631-664.
- Kozak M.** (1995) Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc Natl Acad Sci USA*; **92**:2662–2666.
- Krishna, P. and Gloor, G.** (2001) The Hsp90 family of proteins in *arabidopsis thaliana*. *Cell Stress and Chaperones*, **6**, 238-246.

- Kusnadi, A.R., Nikolov, Z.L. and Howard, J.A.** (1997) Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*, **56**, 473-484.
- Kwiatkowski BA., Zielinska-Kwiatkowska AG., Migdalski A., Kleczkowski LA., Wasilewska LD.** (1995). Cloning of two cDNAs encoding calnexin-like and calreticulin-like proteins from maize (*Zea mays*) leaves: identification of potential calcium-binding domains. *Gene* **165**:219-222.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(5259)**, 680-685.
- Lau OS, Sun SSM.** (2009) Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. *Biotechnol Adv*, doi:10.1016/j.biotechadv.2009.05.005.
- Leborgne-Castel, N., Crofts, A. and Denecke, J.** (1999) Overexpression of BiP in Tobacco Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress. *The Plant Cell* **11**: 459-469
- Lee RWH, Strommer J, Hodgins D, Shewen PE, Niu Y, Lo RYC.** (2001) Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a Mannheimia haemolytica A1 Ikt50 fusion protein. *Infect Immun*; **69**:5786–5793.
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A.C., Gomord, V. and Faye, L.** (1998) N-glycoprotein biosynthesis in plants: Recent developments and future trends. *Plant Molecular Biology*, **38**, 31-48.
- Levin, J.S., Thompson, W.F., Csinos, A.S., Stephenson, M.G. and Weissinger, A.K.** (2005) Matrix attachment regions increase the efficiency and stability of RNA-mediated resistance to Tomato Spotted Wilt Virus in transgenic tobacco. *Transgenic Research*, **14**, 193-206.
- Li L, Shimada T, Takahashi H, Ueda H, Fukao Y, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2006) MAIGO2 is involved in exit of seed storage proteins from the endoplasmic reticulum in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **18**: 3535–3547.
- Li, X. and Okita, T.W.** (1993) Accumulation of prolamines and glutelins during rice seed development: a quantitative evaluation., *Traffics*; **34**, 385 - 390.
- Lis H. and Sharon N.** (1993). Protein glycosylation structural and functional aspects. *Eur J Biochem* **218**:1-27.
- Lopes MA. and Larkins BA.** (1993). Endosperm origin, development, and function. *Plant Cell* **5**:1383-1399.
- Lu J, Sivamani E, Azhakanandam K, Samadder P, Li X, Qu R.** (2008) Gene expression enhancement mediated by the 5' UTR intron of the rice rubi3 gene varied remarkably among tissues in transgenic rice plants. *Mol Genet Genomics*; **279**:563–572.

- Ma, J., Drake, P.M.W., Chargelegue, D., Obregon, P., Prada, A.** (2005) Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production. *Vaccine*, **23**, 1814-1818.
- Mainieri, D, Rossi, M, Archinti, M, Bellucci, M, De Marchis, F, Vavassori, S, Pompa, A, Arcioni, S and Vitale, A** (2004). "Zeolin. A New Recombinant Storage Protein Constructed Using Maize $\{\gamma\}$ -Zein and Bean Phaseolin." *Plant Physiology* **136**(3): 3447-3456.
- Marinos NG.** (1970). Embryogenesis of the pea (*Pisum sativum*). The cytological environment of the developing embryo. *Protoplasma* **70**:261-279.
- Marquet-Blouin E, Bouche FB, Steinmetz A, Muller CP.**(2003) Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol Biol*; **51**:459-469.
- Martín-Alonso JM, Castañón S, Alonso P, Parra F, Ordás R.** (2003) Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *Transgenic Res*; **12**:127-130.
- Martínez, C., Giulietti, A.M., Alvarez, M.A. and Petrucci, S.** (2005) Expression of the antibody 14D9 in *Nicotiana tabacum* hairy roots. *Electronic Journal of Biotechnology*, **8**, 170-176.
- Marty, F.** (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell*; **11**: 587-599.
- Mason HS, Lam DM, Amtxen CJ.** (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*; **89**:11745-11749.
- Matsuoka K., Neuhaus J.,** (1999). Cis-elements of protein transport to the plant vacuoles, *J. Exp. Bot.* **50**: 165-174.
- McGarvey PB, Hammond J, DieneltMM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B.** (1995) Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology*; **13**: 1484-1847.
- Melo NS., Nimt M., Conradt HS., Faveiro PS., Costa J.** (1997). Identification of the human Lewis carbohydrate motif in a secretory peroxidase from a plant cell suspension culture (*Vaccinium myrtillus* L.). *FEBS Lett* **415**:186-191.
- Menegazzi P., Guzzo F., Baldan B., Mariani P., Treves S.** (1993). Purification of calreticulinlike protein(s) from spinach leaves. *Biochem Biophys Res Comm* **190**:1130-1135.
- Menkhaus, T.J., Glatz, C.E., Bai, Y., Zhang, C., Nikolov, Z.L.** (2004) Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants. *Biotechnology Progress*, **20**, 1001-1014.
- Mishra S, Yadav DK, Tuli R.** (2006) Ubiquitin fusion enhances cholera toxin B subunit expression in transgenic plants and the plant-expressed protein binds GM1 receptors more efficiently. *J Biotechnol*; **127**:95-108.

- Molina MI, Otegui M, Petruccelli S.** (2006) Sunflower storage proteins are transported in dense vesicles that contain proteins homologous to the pumpkin vacuolar sorting receptor PV 72. *Electronic Journal of Biotechnology* **9**: 326-330.
- Moloney, M.** (2002) Plant Molecular Farming: Using oleosin Partitioning Technology in Oilseeds. In *Plants as Factories for Protein Production* (Hood, E.E. and Howard, J.A. eds). Norwell, USA: Kluwer Academic Publishers, pp. 55-78.
- Moloney M.M. and Siloto R.M.** (2004). MODIFIED OLEOSINS. In PATENT COOPERATION TREATY APPLICATION, WO04113376, Patent record available from the *World Intellectual Property Organization (WIPO)*.
- Moravec T, Schmidt MA, Herman EM, Woodford-Thomas T.** (2007) Production of Escherichia coli heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine*; **25**:1647–1657.
- Mori, T., Saruta, Y., Fukuda, T., Prak, K., Ishimoto, M., Maruyama, N. and Utsumi, S.** (2009) Vacuolar sorting behaviors of 11S globulins in plant cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **73**, 53-60.
- Morré DJ. and Mollenhauer HH.** (1974). The endomembrane concept: a functional integration of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. In *Dynamics aspects of plant ultrastructure*, A.W. Robards, ed (London: McGraw-Hill), pp. 84-137.
- Muntz, K.** (1998) Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology*, **38**, 77-99.
- Müntz, K.** (1996) Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. *Plant Molecular Biology*, **47**, 605-622.
- Napier RM., Trueman S., Henderson J., Boyce JM., Hawes C., Fricker MD., Venis MA.** (1995). Purification, sequencing and functions of calreticulin from maize. *J Exp Bot* **46**:1603-1613.
- Nebenführ, A.** (2007) Organelle dynamics during cell division. In *Plant Cell Monographs*, pp. 195-206.
- Neuhaus, J. and Rogers, J.** (1998) Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Molecular Biology*, **38**, 127-144.
- Neuhaus, J., Sticher, L., Meins, F.J. and Boller, T.** (1991) A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10362-10366.
- Ngo DA, Garland PA, Mandoli DF.** 2005. Development and organization of the central vacuole of *Acetabularia acetabulum*. *New Phytologist* **165**: 731–746.
- Nguyen HT, Leelavathi S, Reddy VS.** (2004) Bacteriophage T7 RNA polymerase-directed, inducible and tissue-specific over-expression of foreign genes in transgenic plants. *Plant Biotechnol J*; **2**:301–310.

- Nicholson, L.; Gonzalez-Melendi, P.; Van Dolleweerd, C.; Tuck, H.; Perrin, Y.; Ma, J.K.-C.; Fischer, R.; Christou, P. and Stoger, E.** (2005) A recombinant multimeric immunoglobulin expressed in rice shows assembly-dependent subcellular localization in endosperm cells. *Plant Biotechnol. J.* **3**, 115–127.
- Nishimura, E., Kato, M. and Hashizume, S.** (2003) Human Î²-Defensin-2 Induction in Human Foreskin Keratinocyte by Synergetic Stimulation with Foods and Escherichia Coli. *Cytotechnology*, **43**, 135-144.
- Nishizawa, K., Maruyama, N., Satoh, R., Fuchikami, Y., Higasa, T. and Utsumi, S.** (2003) A C-terminal sequence of soybean beta-conglycinin alpha' subunit acts as a vacuolar sorting determinant in seed cells. *Plant J*, **34**, 647-659.
- Nishizawa, K., Maruyama, N. and Utsumi, S.** (2006) The C-terminal region of alpha subunit of soybean beta-conglycinin contains two types of vacuolar sorting determinants. *Plant Molecular Biology*, **62**, 111-125.
- Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M,** (2007). Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA*; **104**:10986–91.
- Noiva R. and Lennarz WJ.** (1992). Protein disulphide isomerase. A multi-functional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **267**:3553-3556.
- Oh, S.J., Jeong, J.S., Kim, E.H., Yi, N.R., Yi, S.I., Jang, I.C., Kim, Y.S., Suh, S.C., Nahm, B.H. and Kim, J.K.** (2005) Matrix attachment region from the chicken lysozyme locus reduces variability in transgene expression and confers copy number-dependence in transgenic rice plants. *Plant Cell Reports*, **24**, 145-154.
- Okamoto, T.; Shimada, T.; Hara-Nishimura, I.; Nishimura, M. and Minamikawa, T.** (2003) C-Terminal KDEL sequence of a KDEL tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle and in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endopeptidase. *Plant Physiol.* **132**: 1892–1900.
- Olbrich A, Hillmer S, Hinz G, Oliviusson P, Robinson DG** (2007) Newly formed vacuoles in root meristems of barley and pea seedlings have characteristics of both protein storage and lytic vacuoles. *Plant Physiology* **145**: 1383-1394.
- Oparka, K.J., Murant, E.A., Wright, K.M., Prior, D.A.M. and Harris, N.** (1991) The drug probenecid inhibits the vacuolar accumulation of fluorescent anions in onion epidermal cells. *Journal of Cell Science*, **99**, 557-563.
- Otegui, M.S., Herder, R., Schulze, J., Jung, R., Staehelin, L.A.** (2006) The proteolytic processing of seed storage proteins in Arabidopsis embryo cells starts in the multivesicular bodies. *Plant Cell* **18**: 2567-2581.
- Paccalet, T., Bardor, M., Rihouey, C., Delmas, F., Chevalier, C., D'Aoust, M.A., Faye, L., Vazina, L., Gomord, V. and Lerouge, P.** (2007) Engineering of a sialic acid synthesis

- pathway in transgenic plants by expression of bacterial Neu5Ac-synthesizing enzymes. *Plant Biotechnology Journal*, **5**, 16-25.
- Pagny, S, Denmat-Ouisse, L-A, Gomord, V and Faye, L (2003)**. "Fusion with HDEL Protects Cell Wall Invertase from Early Degradation when N-glycosylation is Inhibited." *Plant Cell Physiol*, **44**(2): 173-434
- Paris, N, Stanley, CM, Jones, RL and Rogers, JC (1996)**. "Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments." *Cell*. **85**: 563 - 572
- Park, J.H., Oufattole, M. and Rogers, J.C. (2007)** Golgi-mediated vacuolar sorting in plant cells: RMR proteins are sorting receptors for the protein aggregation/membrane internalization pathway. *Plant Science*, **172**, 728-745.
- Park, M., Lee, D., Lee, G.-J. and Hwang, I. (2005)** AtRMR1 functions as a cargo receptor for protein trafficking to the protein storage vacuole. *J. Cell Biol.*, jcb.200504112.
- Park, M., Kim, S.J., Vitale, A. and Hwang, I. (2004)** Identification of the Protein Storage Vacuole and Protein Targeting to the Vacuole in Leaf Cells of Three Plant Species. *Plant Physiology*, **134**, 625-639.
- Pedrazzini E., Giovinazzo G., Bielli A., de Virgilio M., Frigerio L., Pesca M., Faoro F., Bollini R., Ceriotti A., Vitale A. (1997)**. Protein quality control along the route to the plant vacuole. *Plant Cell* **9**:1869-1880.
- Petrucelli, S, Dai, S, Carcamo, R, Yin, Y, Chen, S and Beachy, RN (2001)**. "Transcription factor RF2a alters expression of the rice tungro bacilliform virus promoter in transgenic tobacco plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7635-7640.
- Petrucelli, S.; Otegui, M.S.; Lareu, F.; Tran Dinh, O.; Fitchette, A-C.; Circosta, A.; Rumbo, M.; Bardor, M.; Carcamo, R.; Gomord, V.; Beachy, R.N. (2006)**. A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds. *Plant Biotechnology Journal* **4**: 511-527
- Petrucelli S., Molina I.M., Lareu J.F., Circosta A., (2007)**. Two short sequences from amaranth 11S globulin are sufficient to target green fluorescent protein and beta-glucuronidase to vacuoles in Arabidopsis cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**: 400-409.
- Phillippy BQ. and Mullaney EJ. (1997)**. Expression of an *Aspergillus niger* phytase (*PhyA*) in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem* **45**:3337-3342.
- Pompa, A. and Vitale, A. (2006)** Retention of a bean phaseolin/maize γ -zein fusion in the endoplasmic reticulum depends on disulfide bond formation. *Plant Cell*, **18**, 2608-2621.
- Pompa A, Marchis FD, Vitale A, Arcioni S, Bellucci M (2010)** An engineered C-terminal disulfide bond can partially replace the phaseolin vacuolar sorting signal. *Plant Journal* **61**: 782-791.

- Potula, HHSK, Kathuria, SR, Ghosh, AK, Maiti, TK and Dey, S** (2008). "Transient expression, purification and characterization of bioactive human fibroblast growth factor 8b in tobacco plants." *Transgenic Research* **17**(1): 19-32.
- Pueyo, J.J.; Chrispeels, M.J. and Herman, E.M.** (1995) Degradation of transport-competent destabilized phaseolin with a signal for retention in the endoplasmic reticulum occurs in the vacuole. *Planta*, **196**: 586–596.
- Rademacher, T, Arcalis, E and Stoger, E** (2009). Production and localization of recombinant pharmaceuticals in transgenic seeds. *Methods in Molecular Biology*. **483**: 69-87.
- Rader, R.A.** (2008) (Re)defining biopharmaceutical. *Nature Biotechnology*, **26**, 743-751.
- Raju, T.S., Briggs, J.B., Borge, S.M. and Jones, A.J.S.** (2000) Species-specific variation in glycosylation of IgG: Evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*, **10**, 477-486.
- Ramírez YJP, Tasciotti E, Gutierrez-Ortega A, Torres AJD, Flores MTO, Giacca M,** (2007) Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice. *Clin Vaccine Immunol*; **14**: 685–692.
- Ravi K., Hu C., Reddi PS., van Huistee RB.** (1986). Effect of tunicamycin on peroxidase release by cultured peanut suspension cells. *J Exp Bot* **37**:1708-1715.
- Reichert, J.M. and Healy, E.M.** (2001) Biopharmaceuticals approved in the EU 1995-1999: A European Union-United States comparison. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **51**, 1-7.
- Robinson, D.G., Hinz, G. and Holstein, S.E.** (1998) The molecular characterization of transport vesicles. *Plant Mol Biol*, **38**, 49-76.
- Robinson D., Oliviusson P. and Hinz G.,** (2005). Protein Sorting to the Storage Vacuoles of Plants: A Critical Appraisal. *Traffic* **6**: 615-625
- Rogers, J.C. and Neuhaus, J-M.,** (1998). Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Molecular Biology*, **38**, 127-144.
- Rojo E., Gillmor C.S., Kovaleva V., Somerville C.R. and Raikhel N.V.,** (2001). *VACUOLESS1* is an essential gene required for vacuole formation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *-Dev. Cell* **1**: 303-310.
- Rosales-Mendoza S, Alpuche-Sols AG, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Martnez-Gonzalez L, Herrera-Diaz A,** (2009). Expression of an Escherichia coli antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants. *Plant J*; **57**:45–54.

- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, López-Revilla R, Moreno-Fierros L, Alpuche-Solís AG.** (2008) Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge. *Plant Cell Rep* ; **27**:79–84.
- Rosenberg SA., Grimm EA., McGrogan M., Doyle M., Kawasaki E., Koths K., Mark DF.** (1984). Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*. *Science* **223**:1412-1414.
- Saalbach, G., Jung, R., Kunze, G., Saalbach, I., Adler, K. and Muntz, K.** (1991) Different legumin protein domains act as vacuolar targeting signals. *Plant Cell*, **3**, 695-708.
- Sabharwal, N., Icoz, I., Saxena, D. and Stotzky, G.** (2007) Release of the recombinant proteins, human serum albumin, beta-glucuronidase, glycoprotein B from human cytomegalovirus, and green fluorescent protein, in root exudates from transgenic tobacco and their effects on microbes and enzymatic activities in soil. *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**, 464-469.
- Saint-Jore-Dupas, C., Faye, L. and Gomorod, V.** (2007) From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends Biotechnol* **25** :317–323.
- Saito C,Ueda T,AbeH,Wada Y,Kuroiwa T, Hisada A, FuruyaM, Nakano A** (2002) A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of *Arabidopsis*. *Plant J* **29**: 245–255.
- Samadder P, Sivamani E, Lu J, Li X, Qu R.** (2008) Transcriptional and post-transcriptional enhancement of gene expression by the 5' UTR intron of rice *rubi3* gene in transgenic rice cells. *Mol Genet Genomics*; **279**:429–439.
- Samalova, M., Fricker, M. and Moore, I.** (2006) Ratiometric fluorescence-imaging assays of plant membrane traffic using polyproteins. *Traffic*, **7**, 1701-1723.
- Santino A., Daminati MG., Vitale A., Bollini R.** (1992). The α -amylase inhibitor of bean seed : two-step proteolytic maturation in the protein storage vacuoles of the developing cotyledon. *Physiologia Plantarum* **85**:425-432.
- Satoh, M., Iida, S. and Shitara, K.** (2006) Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **6**, 1161-1173.
- Schaller, A.** (2004). A cut above the rest: The regulatory function of plant proteases. *Planta* **220**, 183-197.
- Schillberg, S., Fischer, R. and Emans, N.** (2003) 'Molecular farming' of antibodies in plants. *Naturwissenschaften*, **90**, 145-155.
- Schillberg S and Twyman RM** (2004) Emerging production systems for antibodies in plants. In: Christou P, Klee H (eds) *Handbook of Plant Biotechnology*. John Wiley & Sons Inc., NY, pp 801-810.

- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E. and Tsien, R.Y.** (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, **22**, 1567-1572.
- Sharma MK, Jani D, Thungapathra M, Gautam JK, Meena LS, Singh Y,** (2008a). Expression of accessory colonization factor subunit A (ACFA) of *Vibrio cholerae* and ACFA fused to cholera toxin B subunit in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). *J Biotechnol*; **135**:22–27.
- Sharma, A.K. and Sharma, M.K.** (2009) Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, **27**, 811-832.
- Sharma MK, Singh NK, Jani D, Sisodia R, Thungapathra M, Gautam JK,** (2008b). Expression of toxin co-regulated pilus subunit A (TCPA) of *Vibrio cholerae* and its immunogenic epitopes fused to cholera toxin B subunit in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Cell Rep*; **27**:307–318.
- Sharp, J.M. and Doran, P.M.** (2001) Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnology Progress*, **17**, 979-992.
- Shewry PR and Casey R.** (1999). *Seed proteins*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Shimada, T.** (2002) A vacuolar sorting receptor PV72 on the membrane of vesicles that accumulate precursors of seed storage proteins (PAC vesicles). *Plant Cell Physiol.* **43**, 1086–1095.
- Shimada T., Fuji K., Tamura K., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I.** (2003). Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:16095-16100.
- Shirai, K. and Fukuda, Y.** (2006) The tobacco CHN50 matrix attachment region enhances transformation frequency. *Plant Biotechnology*, **23**, 535-538.
- Siloto RM, Moloney MM** (2006) METHODS FOR THE MODULATION OF OLEOSIN EXPRESSION IN PLANTS. In PATENT COOPERATION TREATY APPLICATION, WO06037228, Patent record available from the *World Intellectual Property Organization* (WIPO).
- Simons JP., McClenaghan M., Clark AJ.** (1987). Alteration of the quality of milk by expression of sheep betalactoglobulin in transgenic mice. *Nature* **328**:530-532.
- Singh N.D. and Ding, Y.** (2009). Chloroplast-derived vaccine antigens and biopharmaceuticals: Protocols for expression, purification, or oral delivery and functional evaluation. *Methods in Molecular Biology.* **483**: 163-192.
- Sonnewald U., von Schaewen A., Willmitzer L.** (1990). Expression of mutant patatin protein in transgenic tobacco plants: role of glycans and intracellular location. *Plant Cell* **2**:345-355.

- Spitsin S, Andrianov V, Pogrebnyak N, Smirnov Y, Borisjuk N, Portocarrero C,** (2009) Immunological assessment of plant-derived avian flu H5/HA1 variants. *Vaccine*;27:1289–1292.
- Srinivas L, Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Bapat VA.** (2008) Transient and stable expression of hepatitis B surface antigen in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Biotechnol Rep*; 2:1–6.
- Sriraman, R.; Bardor, M.; Sack, M.; Vaquero, C.; Faye, L.; Fischer, R.; Finnern, R. and Lerouge, P.** (2004). Recombinant anti-hCG antibodies retained in the endoplasmic reticulum of transformed plants lack corexylose and core-alpha(1,3)-fucose residues. *Plant Biotechnol. J.* 2: 279–287.
- Staelin, L.A. and Driouich, A.** (1997) Brefeldin A Effects in Plants (Are Different Golgi Responses Caused by Different Sites of Action?). *Plant Physiology*, **114**, 401-403.
- Staelin, L.A. and Moore, I.** (1995) The plant golgi apparatus: Structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Plant Physiology* **46**, 261-288.
- Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N,**(2000). High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol*; **18**:333–138.
- Staudacher E., Dalik T., Wawra P., Altmann F., Marz L.** (1995). Functional purification and characterization of a GDP-fucose: β -N-acetylglucosamine (Fuc to Asn linked GlcNAc) α -1,3-fucosyltransferase from mung beans. *Glycoconj J* **12**:780-786.
- Stevens, L.H., Stoopen, G.M., Elbers, I.J.W., Molthoff, J.W., Bakker, H.A.C., Lommen, A., Bosch, D. and Jordi, W.** (2000) Effect of Climate Conditions and Plant Developmental Stage on the Stability of Antibodies Expressed in Transgenic Tobacco. *Plant Physiology*, **124**, 173-182.
- Stoger, E., Ma, J.K.-C., Fischer, R. and Christou, P.** (2005) Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Current Opinion in Biotechnology*, **16**, 167-173.
- Stomp A, Dickey L, Gasdaska J.**(2004) EXPRESSION OF BIOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE IN DUCKWEED.; *United States Patent* 6815184.
- Streatfield, S.J.** (2007). Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnol J.* **5**, 2-15.
- Swanson S, Bethke P, Jones R** (1998) Barley aleurone cells contain two types of vacuoles: characterization of lytic organelles by use of fluorescent probes. *Plant Cell* **10**: 685-698.
- Tackaberry ES, Dudani AK, Prior F, Tocchi M, Sardana R, Altosaar I,** (1999) Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine*;17:3020–3029.

- Takaiwa, F.; Hirose, S.; Takagi, H.; Yang, L. and Wakasa, Y.** (2009) Deposition of a recombinant peptide in ER-derived protein bodies by retention with cysteine-rich prolamins in transgenic rice seed *In Planta*, Ed **2009**. Springer-Verlag DOI: 10.1007/s00425-009-0905-7.
- Tamura, K., Shimada, T., Ono, E., Tanaka, Y., Nagatani, A., Higashi, S.-i., Watanabe, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.** (2003) Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *Plant J*, **35**, 545-555.
- Tamura, K.; Yamada, K.; Shimada, T. and Hara-Nishimura, I.** (2004) Endoplasmic reticulum-resident proteins are constitutively transported to vacuoles for degradation. *Plant J*. **39**, 393–402.
- Terashima M, Murai Y, Kawamura M, Nakanishi S, Stoltz T, Chen L,** (1999). Production of functional human alpha 1-antitrypsin by plant cell culture. *Appl Microbiol Biotechnol*; **52**:516–523.
- Tetko, I.V., Haberer, G., Rudd, S., Meyers, B., Mewes, H.W. and Mayer, K.F.** (2006) Spatiotemporal expression control correlates with intragenic scaffold matrix attachment regions (S/MARs) in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS computational biology*., **2**: 193-208.
- Timmers ACJ, Tirlapur UK, Schel JHN.** 1995. Vacuolar accumulation of acridine orange and neutral red in zygotic and somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.). *Protoplasma* **188**: 236–244.
- Tiwari, S., Verma, P.C., Singh, P.K., Tuli, R.,** (2009) Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnology Advances*, **27**, 449-467.
- Tomlinson KL., McHugh S., Labbe H., Grainger JL., James LE., Pomeroy KM., Mullin JW., Miller SS., Dennis DT., Miki BLA.** (2004). Evidence that the hexose-to-sucrose ratio does not control the switch to storage product accumulation in oilseeds: analysis of tobacco seed development and effects of overexpressing apoplastic invertase. *J Exp Bot* **55(406)**:2291-2303.
- Torrent, M., Llopart, B., Lasserre-Ramassamy, S., Llop-Tous, I., Bastida, M., Marzabal, P., Westerholm-Pavinen, A., Saloheimo, M., Heifetz, P.B. and Ludevid, M.D.** (2009) Eukaryotic protein production in designed storage organelles. *BMC Biology*, **7**.
- Torrent, M, Llop-Tous, I and Ludevid, MD** (2009). Protein body induction: A new tool to produce and recover recombinant proteins in plants. *Methods in Molecular Biology*. **483**: 193-208.
- Torres, E.; Gonzalez-Melendi, P.; Stoger, E.; Shaw, P.; Twyman, R.M.; Nicholson, L.; Vaquero, C.; Fischer, R.; Christou, P. and Perrin, Y.** (2001)- Native and artificial reticuloplasmids co-accumulate in distinct domains of the endoplasmic reticulum and in post-endoplasmic reticulum compartments. *Plant Physiol*. **127**, 1212–1223.

- Toyooka, K.; Okamoto, T. and Minamikawa, T.** (2000) Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J. Cell Biol.* **148**: 453–464.
- Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F,** (2003) Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res*; **31**:1174–1179.
- Triguero, A.; Cabrera, G.; Cremata, J.A.; Yuen, C.-T.; Wheeler, J. and Ramirez, N.I.** (2005). Plant-derived mouse IgG monoclonal antibody fused to KDEL endoplasmic reticulum-retention signal is N-glycosylated homogeneously throughout the plant with mostly high-mannose-type N-glycans. *Plant Biotechnol. J.* **3**: 449–457.
- Tuboly T, YuW, Bailey A, Degrandis S, Du S, Erickson L,** (2000). Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine*; **18**:2023–2028.
- Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. and Fischer, R.** (2003) Molecular farming in plants: Host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*, **21**, 570-578.
- Vain P, Worland B, Kohli A, Snape JW, Christou P, Allan GC,** (1999). Matrix attachment regions increase transgene expression levels and stability in transgenic rice plants and their progeny. *Plant J*; **18**:233–242.
- Van Deurs, B., Holm, P.K., Kayser, L., Sandvig, K. And Hansen, S.H.** (1993) Multivesicular bodies in Hep-2 cells are maturing endosomes. *Eur. J. Cell Biol.*, 61 208-224.
- Van Droogenbroeck, B., Cao, J., Stadlmann, J., Altmann, F., Colanesi, S., Hillmer, S., Robinson, D.G., Van Lerberge, E., Terryn, N., Van Montagu, M., Liang, M., Depicker, A., and De Jaeger, G.** (2007). Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic Arabidopsis seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1430-1435.
- Van Ree, R., Cabanes-Macheteau, M., Akkerdaas, J., Milazzo, J.P., Loutelier-Bourhis, C., Rayon, C., Villalba, M., Koppelman, S., Aalberse, R., Rodriguez, R., Faye, L. and Lerouge, P.** (2000) Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem*, **275**, 11451-11458.
- Verma, D., Verma, M., Dey, M., Jain, R.K. and Wu, R.** (2005) Molecular dissection of the tobacco Rb7 matrix attachment region (MAR): Effect of 5' half on gene expression in rice. *Plant Science*, **169**, 704-711.
- Vitale A.,** (2001). Uncovering Secretory Secrets: Inhibition of Endoplasmic Reticulum (ER) Glucosidases Suggests a Critical Role for ER Quality Control in Plant Growth and Development. *The Plant Cell* **13**: 1260-1262.

- Vitale A and Chrispeel MJ.** (1984). Transient N-acetylglucosamine in the biosynthesis of phytohemagglutinin: attachment in the Golgi apparatus and removal in the protein bodies. *J Cell Biol* **99**:133-140.
- Vitale, A. and Hinz, G.** (2005) Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *Trends in Plant Science*, **10**, 316-323.
- Vitale, A. and Pedrazzini, E.** (2005) Recombinant pharmaceuticals from plants: The plant endomembrane system as bioreactor. *Molecular Interventions*, **5**, 216-225.
- Vitale, A., Bielli, A. and Ceriotti, A.** (1995) The Binding Protein Associates with Monomeric Phaseolin. *Plant Physiology*, **107**, 1411-1042.
- Vitale, A. and Raikhel, N.** (1999). What do proteins need to reach different vacuoles? *TRENDS in Plant Science* **4**: 149-155.
- von Schaewen, A. and Chrispeels, M.** (1993) Identification of vacuolar sorting information in phytohemagglutinin, an unprocessed vacuolar protein. *J. Exp Botany*, **44**, 339-342.
- Walsh, G.U.** (2004) Second-generation biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **58**, 185-196.
- Walter P. and Blobel G.** (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes in in vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* **91**:551-556.
- Wandelt, C.I., Khan, M.R.I., Craig, S., Schroeder, H.E., Spencer, D., Higgins, T.J.V. and Wandelt, C.I.** (1992) Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *Plant Journal*, **2**, 181-192.
- Wang, J., Li, Y., Sze, W.L., Hillmer, S., Sun, S.S.M., Robinson, D.G. and Jiang, L.** (2007) Protein mobilization in germinating mung bean seeds involves vacuolar sorting receptors and multivesicular bodies. *Plant Physiology*, **143**, 1628-1639.
- Wang, T.Y., Yang, R., Qin, C., Wang, L. and Yang, X.J.** (2008) Enhanced expression of transgene in CHO cells using matrix attachment region. *Cell Biology International*, **32**, 1279-1283.
- Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson AL,** (2003) Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virol*; **77**:8702–8711.
- Webster DE, Cooney ML, Huang Z, Drew DR, Ramshaw IA, Dry IB,** (2002). Successful boosting of a DNA measles immunization with an oral plant-derived measles virus vaccine. *J Virol*; **76**:7910–7912.
- Wigdorovitz A, Perez Filgueira DM, Robertson N, Carrillo C, Sadir AM, Morris TJ,** (1999a) Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus

- (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. *Virology*; **264**:85–91.
- Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos MJ, Trono K, Peralta A, Gómez MC**, (1999b) Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*; **255**:347–353.
- Wilkins TA., Bednarek SY., Raikhel NV.** (1990). Role of propeptide glycan in posttranslational processing and transport of barley lectin to vacuoles in transgenic tobacco. *Plant Cell* **2**:301-313.
- Wright, K.E.; Prior, F.; Sardana, R.; Altosaar, I.; Dudani, A.K.; Ganz, P.R. and Tackaberry, E.S.** (2001) Sorting of glycoprotein B from human cytomegalovirus to protein storage vesicles in seeds of transgenic tobacco. *Transgenic Res.* **10**, 177–181.
- Wu CY, Suzuki A, Washida H, Takaiwa F.** (1998) The GCN4 motif in a rice glutelin gene is essential for endosperm-specific gene expression and is activated by Opaque-2 in transgenic rice plants. *Plant J*; **14**:673–683.
- Wujek P., Kida E., Walus M., Wisniewski KE., Golabek AA.** (2004). N-glycosylation is crucial for folding, trafficking, and stability of human tripeptidyl-peptidase I. *J Biol Chem* **279**:12827-12839.
- Yang, D.; Huang, N.; Guo, F.; Liu, B. and Watkins, S.C.** (2003) Expression and localization of human lysozyme in the endosperm of transgenic rice. *Planta*, **216**, 597–603.
- Yang D, Wu L, Hwang YS, Chen L, Huang N.** (2001) Expression of the REB transcriptional activator in rice grains improves the yield of recombinant proteins whose genes are controlled by a Reb-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*; **98**:11438–11443.
- Yang Z, Liu Q, Pan Z, Yu Z, Jiao X.** (2007) Expression of the fusion glycoprotein of newcastle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. *Vaccine* ; **25**:591–598.
- Youma JW, Jeon JH, Kim H, Kim YO, Ko K, Joung H,** (2008) Transgenic tomatoes expressing human beta-amyloid for use as a vaccine against Alzheimer's disease. *Biotechnol Lett*; **30**:1839–1845.
- Zeleny , R. , Kolarich , D. , Strasser , R. , and Altmann , F.** (2006) Sialic acid concentrations in plants are in the range of inadvertent contamination . *Planta*; **224** : 222–227.
- Zeng Y., Bannon G., Thomas Hayden V., Rice K., Drake R., Elbein A.** (1997). Purification and specificity of β 1, 2-xylosyltransferase, an enzyme that contributes to the allergenicity of some plant proteins. *J Biol Chem* **272**:31340-31347.

Zheng, H., Moore, I., Zheng, H., Hawes, C. and Kunst, L. (2004) A GFP-based assay reveals a role for RHD3 in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Plant Journal*, **37**, 398-414.