



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

Trabajo de Tesis Doctoral

**“Estudio de señales de direccionamiento vacuolar del receptor AtRMR1 y su aplicación en la expresión de un anticuerpo recombinante en plantas”**

*Lic. Camila María Scabone | Directora: Dra. Silvana Petruccelli*



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



**Centro de Investigación y Desarrollo en  
Criotecología de  
Alimentos**  
CIDCA-CCT-LA PLATA-CONICET-UNLP

**Tesis para optar al título de  
Doctor de la Universidad Nacional de La Plata**

**ESTUDIO DE SEÑALES DE DIRECCIONAMIENTO  
VACUOLAR DEL RECEPTOR AtRMR1 Y SU APLICACIÓN  
EN LA EXPRESIÓN DE UN ANTICUERPO  
RECOMBINANTE EN PLANTAS**

**Autora:** Lic. Camila María Scabone

**Directora:** Dra. Silvana Petruccelli

**2012**

“Uno no advierte jamás lo que está hecho, sólo puede ver lo que falta por hacer”

*Marie Curie*

**El presente trabajo de Tesis es para optar al título de DOCTOR en Ciencias de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata, Área Ciencias Biológicas, realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, UNLP-CONICET CCT La Plata), bajo la dirección de la Dra. Silvana Petruccelli. La Plata, 2012**

## **Agradecimientos**

*A la Dra. Silvana Petruccelli, por haber confiado en mí para la realización de este trabajo y por su imprescindible ayuda en la redacción de esta tesis porque supo estar atenta para criticar y perfeccionar este manuscrito.*

*Al Dr. Lorenzo Frigerio, por permitirme trabajar con él, su inmensa ayuda con opiniones y sugerencias experimentales, que encaminaron este trabajo de tesis y ser una excelente persona! A stefano Gattolini y Hannah Lee por la ayuda, paciencia y por hacerme sentir estar en casa.*

*A Bruno Vecchi, por el esfuerzo en conjunto en la realización de los experimentos de clonado de anticuerpos, que aquí se muestran y por todos los lindos momentos compartidos.*

*A Alecita londero, por su gran compañía en esta última etapa, su amistad y por ser tan buena persona!*

*A mis amigas que conocí en este camino, por estar siempre ahí para escucharme y apoyarme. Por su amistad y compañerismo!!*

*A mis compañeros del CIDCA, por todos los buenos momentos que hicieron mas ameno el día a día.*

*A Mati, por la contención y estar siempre que te necesite.*

*A mi hermana Sofía, que me ayudaste en el día a día y fuiste un soporte fundamental para la realización de esta tesis.*

*A mis padres, por su apoyo constante y por el gran esfuerzo que hicieron para que pueda estudiar, sin ellos nada de esto hubiera sido posible.*

*Muchas gracias.*

## Publicaciones del presente trabajo

---

- **EN REVISTAS CIENTÍFICAS**

Scabone CM, Frigerio L, Petruccelli S (2011). A fluorescent reporter protein containing AtRMR1 domains is targeted to the storage and central vacuoles in *Arabidopsis thaliana* and tobacco leaf cells. *Plant Cell Reports* 30:1823-1833.

- **PARTICIPACIÓN EN REUNIONES CIENTÍFICAS**

***Comunicaciones orales:***

Los dominios del receptor de direccionamiento vacuolar AtRMR1 direccionan RFP al lumen vacuolar de distintos tipos celulares en *Arabidopsis thaliana*. SAFV 2010. Scabone M. Camila, Lorenzo Frigerio y Silvana Petruccelli. La Plata, Argentina.

***Comunicaciones como póster:***

1- Evaluación de distintas proteínas fluorescentes para el estudio de la vía secretoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* y *tabacum*. Camila M. Scabone, Bruno Vecchi, Silvana Petruccelli. SAFV 2008. Rosario, Argentina. Congreso latinoamericano.

2- Detección de diferentes marcadores vacuolares en *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*. Camila M. Scabone y Silvana Petruccelli. REDBIO 2009. Rosario, Argentina. Congreso internacional.

3- Clonado de las secuencias codificantes para las zonas variables de la cadena variable y pesada del anticuerpo monoclonal anti-gliadinas y su expresión en *E. coli*. Camila M. Scabone y Silvana Petruccelli. REDBIO 2009, Rosario, Argentina. Congreso internacional.

4- Estrategias para aumentar los niveles de expresión en *E. coli* del anticuerpo monoclonal específico anti-gliadina. Camila M. Scabone, Bruno Vecchi, Silvana Petruccelli. SAI 2009. Mar del Plata, Argentina. Congreso nacional.

5- Transient expression of a human tissue transglutaminase (htTG) specific antibody in *Nicotiana benthamiana*. Camila M. Scabone y Silvana Petruccelli. PBVA 2011. Plant-Based Vaccines and Antibodies 2011. Porto, Portugal. Congreso internacional.

6- The fusion to a transmembrane domain as strategy to sort a monoclonal antibody to vacuoles. Camila M. Scabone y Silvana Petruccelli. Biotecnología Habana 2011. Cuba 2011. Congreso internacional.

## Índice de contenidos

---

Agradecimientos .....	i
Publicaciones del presente trabajo .....	ii
Índice de contenidos .....	iii
Abreviaturas.....	viii
Resumen .....	x
<b>INTRODUCCION GENERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Anticuerpos: características estructurales y clonado molecular.....</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades de la estructura de inmunoglobulinas .....	2
1.2 Genética de inmunoglobulinas .....	3
1.3 Clonado molecular de genes de inmunoglobulinas.....	5
<b>2. Los anticuerpos terapéuticos comercializados en la actualidad y la necesidad de mejorar los métodos de producción.....</b>	<b>8</b>
2.1 Clases de inmunoglobulinas terapéuticas y sus blancos .....	8
2.2 La demanda de producción de anticuerpos completos.....	12
2.3 Las plantas como sistema de expresión alternativa para la producción de anticuerpos.....	13
<b>3. La vía secretoria en células vegetales .....</b>	<b>14</b>
3.1 Las células vegetales presentan vacuolas de distintas características.. ..	14
3.2 Las rutas de transporte a vacuolas.....	15
3.3 Señales de direccionamiento vacuolar de proteínas “carga” solubles.....	18
3.3.1 Señales secuencias específicas (ssVSS).....	19
3.3.2 Señales C-terminales (ctVSS).....	20
3.3.3 Señales físicas (psVSS).....	20
3.4 Señales de direccionamiento vacuolar de proteínas “carga” de membrana .....	21
3.5 Los receptores putativos de direccionamiento vacuolar .....	22
3.5.1 La familia de receptores de direccionamiento vacuolar VSR.....	22
3.5.2 La familia de receptores de direccionamiento vacuolar RMR.....	26
3.6 La N-glicosilación diferencial entre células vegetales y mamíferas.....	30
<b>4. Las plataformas de producción de anticuerpos completos en plantas: la situación actual.....</b>	<b>33</b>
4.1 Particularidades del proceso de síntesis, plegamiento y secreción de inmunoglobulinas .....	33
4.2 Los anticuerpos completos expresados en plantas.....	37
4.3 Análisis de las distintas estrategias que han sido empleadas para mejorar los rendimientos de anticuerpos en plantas.....	46
4.3.1 Elementos que controlan la expresión génica.....	46
4.3.2 Direccionamiento subcelular .....	47
4.3.3 Expresión en distintas especies y tejidos vegetales. ....	49
4.3.4 Sistema de expresión basado en vectores virales .....	50

4.3.5 Supresores de silenciamiento.....	50
4.3.6 Degradación de anticuerpos expresados en plantas .....	51
4.4 Glicoingeniería como estrategias para producir anticuerpos completos de mayor actividad específica y farmacocinética mejorada .....	52
4.5 Proteínas terapéuticas producidas en plantas: ingreso a ensayos de evaluación . clínica y las perspectivas de aprobación por los organismos regulatorios .....	53
5. El direccionamiento a vacuolas como estrategia para estabilizar e incrementar la acumulación de proteínas recombinantes.....	56
 OBJETIVOS.....	 59
 RESULTADOS .....	 60
 CAPITULO I: .....	 60
"CLONADO MOLECULAR Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE ANTICUERPOS CON POTENCIALES APLICACIONES EN DIAGNÓSTICO "	
I. Introducción .....	60
I. Resultados .....	62
I.1 Clonado molecular de los anticuerpos 2G3, 1B4E9 y 3B4H1 .....	62
I.2 Análisis de las secuencias de los dominios variables de las inmunoglobulinas amplificadas.....	67
I.3 Análisis de la funcionalidad de las cadenas clonadas de los anticuerpo 2G3 y 1B4E9 mediante su expresión en <i>E.coli</i> .....	76
I.3.1 Expresión de los Fab 2G3 y 1B4E9 murinos en bacterias.....	76
I.3.2 Quimerización y construcción de anticuerpos simple cadena (scFv).....	77
I.3.3 Funcionalidad del Fab 1B4E9.....	82
I.3.4 Funcionalidad del FAb 2G3.....	83
I. Discusión.....	83
I. Perspectivas.....	88
 CAPITULO II: .....	 89
"CARACTERIZACION DE DOMINIOS DEL RECEPTOR DE DIRECCIONAMIENTO VACUOLAR AtRMR1 COMO SEÑALES DE DIRECCIONAMIENTO VACUOLAR "	
II. Introducción .....	89
II. Resultados .....	90
II.1 Obtención de las construcciones secRFP y RFP-TMCT.....	90
II.2 Los ensayos de expresión transitoria en hojas de <i>N. tabacum</i> mostraron que la proteína reportera RFP-TMCT se localiza en lumen de la vacuola central de células epidérmicas. ....	91
II.3 Los ensayos de expresión estable en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mostraron que la proteína reportera RFP-TMCT se localiza en la vacuola central en hojas y raíces y en PSV en semillas .....	92
II.4 La proteína reportera RFP-TMCT se asocia a membranas microsomales y se comporta como una proteína integral de membrana.....	95

II.5 RFP-TMCT colocaliza parcialmente con el marcador de ER pero no con marcadores posteriores de la vía secretoria .....	98
II. Discusión .....	99
II. Conclusiones y Perspectivas .....	105
<b>CAPITULO III: .....</b>	<b>106</b>
<b>" EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO 2G3 FUSIONADO A SEÑALES DE DIRECCIONAMIENTO VACUOLAR EN PLANTAS "</b>	
III. Introducción .....	106
III. Resultados .....	107
III.1 Obtención de las construcciones del anticuerpo 2G3 completo para su expresión en plantas .....	107
III.2 Expresión transitoria en hojas de <i>N. benthamiana</i> de los genes <i>IgL</i> e <i>IgH</i> 2G3 fusionado a RFP y distintas señales de direccionamiento por separado .....	109
III.3 Expresión transitoria en hojas de <i>N. benthamiana</i> del anticuerpo 2G3 completo fusionado a RFP y distintas señales de direccionamiento.....	111
III.4. Niveles de acumulación del anticuerpo 2G3-FP fusionado a distintas señales de direccionamiento en hojas de <i>N. benthamiana</i> .....	112
III. Discusión .....	113
III. Conclusiones y Perspectivas .....	116
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>117</b>
1. Materiales .....	117
1.1 Reactivos químicos .....	117
1.2 Medios de cultivos para bacterias .....	117
1.3 Soluciones de antibióticos empleadas .....	117
1.4 Cepas bacterianas .....	118
1.5 Vectores plasmídicos utilizados .....	118
1.6 Primers utilizados .....	119
1.6.1 Estrategia general de clonados de inmunoglobulinas.....	119
1.6.2 Obtención de las construcciones secRFP y RFP-TMCT.....	122
1.6.3 Obtención de las construcciones del anticuerpo 2G3 completo fusionados a distintas señales de direccionamiento .....	122
1.7 Vectores con genes reporteros .....	122
2. Metodologías .....	123
2.1 Técnicas de ácidos nucleicos.....	123
2.1.1 Aislamiento de RNA total.....	123
2.1.2 Síntesis de la primera cadena del cDNA.....	123
2.1.3 Reacciones de PCR .....	124
2.1.3.1 Amplificación de la $\beta$ -actina .....	125
2.1.3.2 Amplificación de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas .....	125
2.1.3.3 Amplificaciones por OE ( <i>overlap extension</i> ) para obtener Fab quiméricos .....	126



2.1.3.4	Amplificaciones por OE ( <i>overlap extension</i> ) para obtener scFV murinos (VL-VH) .....	128
2.1.3.5	Amplificación de las construcciones secRFP y RFP-TMCT .....	130
2.1.3.6	Amplificación de las construcciones LC-FP, HC-RFP, HC-FP-AFVY, HC-FP-TMCT .....	131
2.1.4	Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	133
2.1.5	Purificación de DNA a partir de gel de agarosa utilizando un kit comercial (HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Mini-kit, RealGenomics™) .....	133
2.1.6	Minipreparación de DNA plasmídico .....	133
2.1.7	Digestiones enzimáticas .....	134
2.1.7.1	Productos de PCR y Vector con <i>Sfi</i> I .....	134
2.1.8	Estrategias de clonados .....	135
2.1.8.1	TOPO-TA Cloning® (Invitrogen) .....	135
2.1.8.2	Clonado en el sistema Gateway (Invitrogen) .....	135
2.1.8.2.1	pENTR-D-TOPO y Recombinación sitio específica (LR clonasa) .....	135
2.1.8.2.2	pCR®/GW/TOPO y Recombinación sitio específica (LR clonasa) .....	135
2.1.8.3	Fab quiméricos .....	136
2.1.8.4	scFV murinos (VL-VH) .....	136
2.1.9	Colony-PCR .....	136
2.1.10	Secuenciación .....	136
2.2	Herramientas bioinformáticas .....	137
2.2.1	Diseño de estrategias de clonado .....	137
2.2.2	Análisis de secuencias .....	137
2.3	Manipulación de bacterias- <i>E. coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> - .....	137
2.3.1	Preparación de células competentes de <i>E.coli</i> DH10 .....	137
2.3.2	Transformación química de células competentes de <i>E.coli</i> DH10 y One Shot® Chemically Competent <i>E. coli</i> (Invitrogen) .....	138
2.3.3	Expresión en <i>E.coli</i> .....	139
2.3.4	Preparación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	139
2.3.5	Transformación por electroporación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	139
2.4	Manipulación de plantas- <i>A. thaliana</i> , <i>N. benthamiana</i> y <i>tabacum</i> - .....	140
2.4.1.	Mantenimiento de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	140
2.4.2.	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por 'floral dip' .....	140
2.4.3.	Identificación de las plantas transgénicas .....	140
2.4.4.	Mantenimiento de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Nicotiana tabacum</i> .....	141
2.4.5.	Esterilización y germinación de semillas .....	141
2.4.6.	Transformación de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>tabacum</i> por Agroinfiltración .....	141
2.5	Microscopía confocal .....	142
2.6	Técnicas de proteínas .....	142
2.6.1	Extracción proteica de <i>E.coli</i> .....	142
2.6.2	Extracción de proteínas totales desde hojas .....	143
2.6.3	Obtención de Microsomas .....	143

2.6.4 Obtención de vacuolas .....	144
2.6.5 SDS-PAGE .....	144
2.6.6 Western blot .....	145
2.6.7 ELISA .....	146
BIBLIOGRAFIA.....	147
ANEXO .....	165

## Abreviaturas

---

Amp	Ampicilina
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	DNA copia
CDR	Región determinante de la complementariedad
CL	Dominio constante de la cadena liviana
CLSM	Microscopio Láser Confocal espectral
CT	Cola citosólica
ctVSS	Señal de Direccionamiento Vacuolar C-terminal
CH	Dominio constante de la cadena pesada
DNA	Acido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DW	peso húmedo
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Retículo Endoplásmico
Fab	Fragmento de unión al antígeno
Fc	Fragmento cristalizable
FR	región framework; región de la cadena variable ubicada entre los CDRs
Fv	Fragmento variable
FW	peso seco
HRP	Peroxidasa de rábano
htTG	Transglutaminasa tisular humana
Ig G	Inmunoglobulina Gamma
Ig	Inmunoglobulina
IPTG	IsoPropyl- $\beta$ -D-ThioGalactopyranoside
Kan	kanamicina
KDa	kilodalton
mAbs	anticuerpos monoclonales
MBP	Proteína de unión a maltosa (maltose binding protein)
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ON	Durante la noche (overnight)
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfato salino
PBST	PBS + Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
PSV	Vacuola de Almacenamiento de Proteínas
RFP	Proteína Roja Fluorescente monomérica.
RMR	Receptor de membrana Ring-H2

scFv	Fragmento variable de cadena única
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturalizante
SP	Péptido Señal
Tet	Tetraciclina
TIP	Proteína intrínseca de tonoplasto
TM	transmembrana
TSP	Proteína Total soluble
VH	Dominio variable de la cadena pesada
VL	Dominio variable de la cadena liviana
VSR	Receptor de direccionamiento vacuolar
VSS	Señales de Direccionamiento Vacuolar

## Resumen

Existe una creciente necesidad de desarrollo de plataformas de producción, a gran escala y de bajo costo, de anticuerpos completos, de manera de satisfacer sus demandas en los distintos tipos de aplicaciones, terapéuticas o diagnósticas. Las plantas son potencialmente el sistema de producción más económico, sin embargo todavía hay que superar varios obstáculos, entre ellos la degradación proteolítica que impacta sobre la calidad y los niveles de acumulación de los anticuerpos producidos. En este trabajo se desarrolló y evaluó una estrategia de direccionamiento a vacuolas de reserva como método para mejorar la acumulación de inmunoglobulinas en células vegetales. Para este estudio, se partió de hibridomas que producían los anticuerpos 1B4E9 y 3B4H1 específicos de prolaminas y 2G3 específico de transglutaminasa tisular humana (htTG). Estos anticuerpos monoclonales fueron escogidos como modelos de inmunoglobulinas de ratón por sus aplicaciones en diagnóstico. Se realizó el clonado molecular de estas inmunoglobulinas y luego realizó los subclonados en vectores de expresión bacterianos para verificar su funcionalidad. Por otro lado, a fin de identificar señales que permitieran un direccionamiento vacuolar más eficiente se realizó una disección funcional del receptor AtRMR1, generando una construcción reportera, que contenía la proteína fluorescente roja (RFP) y los dominios transmembrana y citosólico (TMCT) del receptor AtRMR1 denominada RFP-TMCT, que fue evaluada por expresión transiente en tabaco y estable en arábidopsis. Se demostró que los dominios TMCT del receptor AtRMR1 son suficientes para dirigir a RFP a vacuola central en hojas y raíces y a vacuola de almacenamiento proteico en semillas. Además, los estudios bioquímicos indicaron que RFP-TMCT se encuentra asociada a microsomas y se comporta como una proteína integral de membrana. Posteriormente al llegar a vacuola central, RFP-TMCT se internaliza, acumulándose de manera estable en hojas.

Los genes codificantes para las regiones variables del anticuerpo 2G3 fueron fusionadas a las secuencias codificantes para las regiones constantes kappa de la cadena liviana (2G3-LC) y gamma 1 de la cadena pesada de ratón (2G3-HC) y a RFP, generando 2G3-LC-RFP y 2G3-HC-RFP, respectivamente. Se prepararon tres versiones de la construcción 2G3-HC-RFP: secretoria (2G3-HC-RFP), vacuolar con la señal de direccionamiento carboxilo terminal de la faseolina (2G3-HC-RFP-AFVY) y vacuolar con las regiones de AtRMR1 estudiadas (2G3-HC-RFP-TMCT). Estas construcciones fueron co-expresadas temporalmente en hojas de *Nicotiana benthamiana*, en presencia de los supresores de silenciamiento postranscripcional p19 y Hc-Pro. Por microscopia confocal se determinó que 2G3-Ig-RFP (2G3-LC-RFP y 2G3-HC-RFP) presenta principalmente un patrón típico de apoplasto, mientras que 2G3-Ig-RFP-AFVY (2G3-LC-RFP y 2G3-HC-AFVY) y que 2G3-Ig-RFP-TMCT (2G3-LC-RFP y 2G3-HC-RFP-TMCT) se encuentran en vacuola central. Este patrón es diferente del obtenido para la expresión de las cadenas individuales livianas y pesadas ya que 2G3-LC-RFP localiza en apoplasto y 2G3-HC-RFP presenta un patrón típico de retículo endoplásmico que es

consistente con el modelo del proceso de ensamblado de anticuerpos, en donde la cadena pesada queda retenida en retículo endoplasmático sino adquiere su plegamiento correcto, que ocurre cuando se ensambla con la cadena liviana. Estas modificaciones en la localización sugieren un plegamiento de la inmunoglobulina que aunque esta fusionada a cuatro moléculas de RFP es capaz de avanzar en la vía secretoria. Los niveles de acumulación del anticuerpo fueron mayores cuando se empleó la señal de direccionamiento AFVY, que los obtenidos para la versión secretoria y la fusionada a TMCT del receptor AtRMR1. Los resultados mostrados en este trabajo, sugieren que el direccionamiento vacuolar es una estrategia adecuada para evitar la degradación de inmunoglobulinas en el apoplasto incrementándose los niveles de acumulación, y también que las células vegetales son capaces de producir anticuerpos fusionados a proteínas fluorescentes lo que puede facilitar la obtención de inmunoglobulinas fluorescentes con alta actividad específica.

**Palabras claves:**

Direccionamiento vacuolar, anticuerpos recombinantes, vacuolas de reserva, vacuola central, las plantas como bio-reactores, receptores vacuolares, AtRMR1



# **Introducción general**



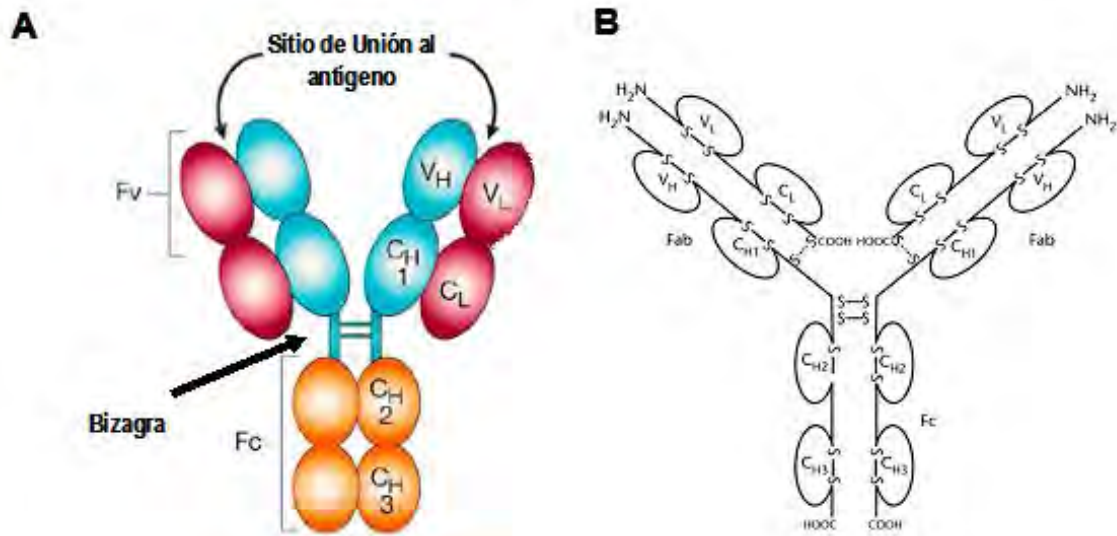
## **1. Anticuerpos: características estructurales y clonado molecular**

### **1.1 Generalidades de la estructura de inmunoglobulinas**

Los anticuerpos (Ab) son una clase de glicoproteínas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas que se encuentran en la sangre y fluidos de vertebrados. Se conocen cinco clases de inmunoglobulinas (Ig): IgM, IgD, IgG, IgA y IgE, que difieren en sus regiones constantes. Las inmunoglobulinas G (IgG) son las más abundantes en suero (8-16mg/ml), son las responsables de la respuesta inmune secundaria (que sigue a la respuesta primaria mediada por IgM) y en la actualidad son las más importantes en aplicaciones farmacéuticas. La estructura clásica de las IgG consiste en dos cadenas livianas (LC) y dos pesadas (HC) de 25 kDa y 50 kDa, respectivamente que se unen covalentemente a través de uniones disulfuros (Figura 1). Las LCs están compuestas por una región constante (CL) y un dominio variable (VL) mientras que las HCs poseen tres regiones constantes (CH1, CH2 y CH3) y una variable (VH) (Figura 1A). Las HCs se unen covalentemente entre sí en la región denominada bizagra y las LC se unen covalentemente a las HCs mediante enlaces disulfuros (Figura 1B). Los dominios variables son de aproximadamente 110 aminoácidos y es donde se localiza la variabilidad de la estructura de las inmunoglobulinas, a diferencia de los dominios constantes (Figura 2A). Los dominios variables se pliegan formando la estructura que reconoce el antígeno y que es conocida como Fv (VL y VH). Cada VL y VH posee tres lazos hipervariables que se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) 1, 2 y 3 que son los que otorgan a estos dominios mayor diversidad y especificidad por el antígeno (Figura 2B, lazos CDR).

El empleo de técnicas de biología molecular ha permitido combinar las distintas regiones de inmunoglobulinas (Figura 3). Un anticuerpo quimérico posee dominios variables de una especie y constante de otra. También a efectos de reducir la antigenicidad de anticuerpos terapéuticos pueden introducirse los CDRs específicos de un determinado antígeno de una especie (por ejemplo ratón), en una inmunoglobulina humana con el objetivo de otorgarle la propiedad de reconocer dicho antígeno. Este tipo de anticuerpos se conoce como humanizado. Otros anticuerpos útiles en terapia y otras aplicaciones por su reducido tamaño son los fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos simple cadena (scFv) están formados por el VH y VL unidos a través de un polipeptídico corto. Los fragmentos Fab, son fragmentos monovalentes formados por la VL-CL de la LC y VH-CH1 de la HC.



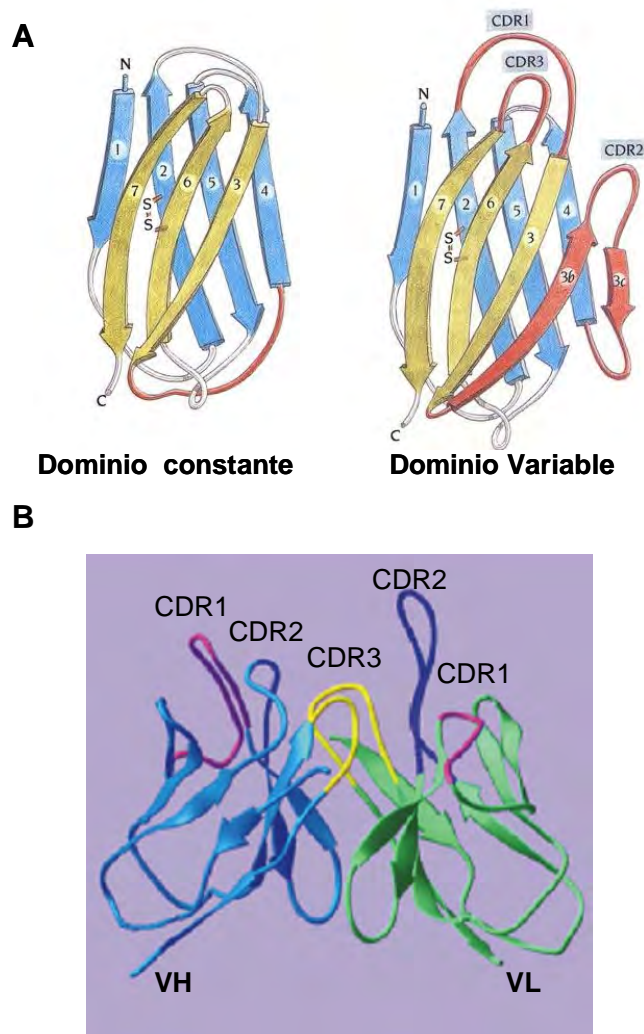


**Figura 1: Representación esquemática de una inmunoglobulina G (IgG) típica. Parte A:** Se muestra la estructura heterotetramérica formada por dos cadenas pesadas y dos livianas. Las cadenas pesadas están formadas por tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3) y un dominio variable (VH) y están unidas entre sí por la región constante mediante puentes disulfuro entre cisteínas conservadas. Las cadenas livianas están formadas por un solo dominio constante (CL) y un dominio variable (VL). **Parte B:** Las cadenas pesadas y livianas se representan con líneas sólidas, con las uniones disulfuro intramoleculares entre residuos de cisteínas (S-S) de cada dominio de la inmunoglobulina.

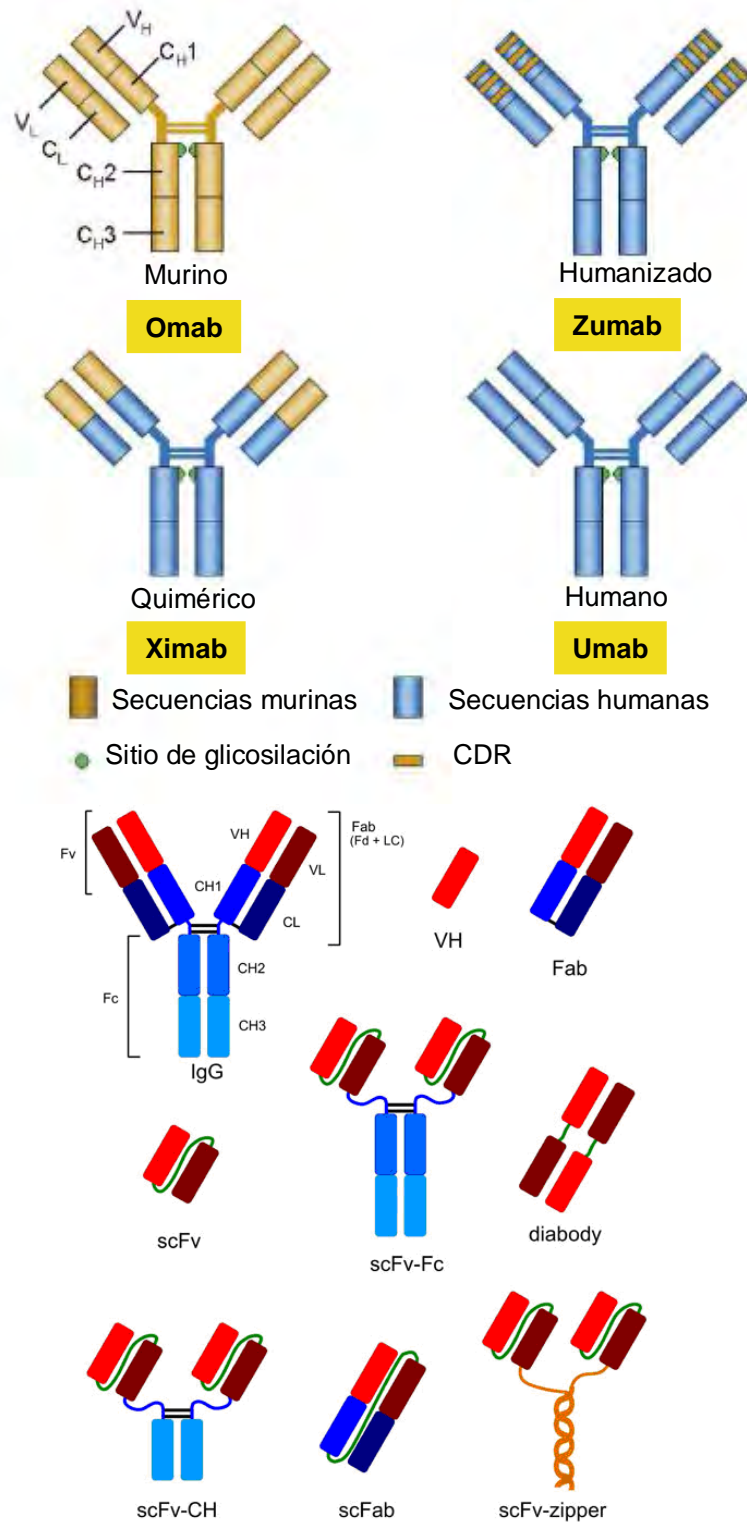
## 1.2 Genética de inmunoglobulinas

Los vertebrados poseen un mecanismo de defensa altamente especializado conocido como respuesta inmune adaptativa. Esta respuesta es posible gracias a que las células B poseen un repertorio de receptores B para el antígeno de una diversidad virtualmente ilimitada. El vasto repertorio de inmunoglobulinas, en vez de estar codificado por un enorme número de genes, se genera por un sistema de diversificación combinatorio. Las HCs están codificadas por cuatro segmentos de genes: variable (V), diversidad (D), unión (J, del inglés, *joining*) y constantes (C) mientras que las LCs por tres: V, J, y C. Las LC humanas surgen de combinación de 40V y 5J para la cadena kappa y 30V y 4J para lambda, mientras que en ratón son 85V y 5J para la cadena kappa y 2V y 4J para lambda (Figura 4A). Las HC humanas se generan por combinación aleatoria entre 51 V, 27D y 6J, mientras que en ratón se combinan 134 V, 13D y 4J (Figura 4A) (Kindt y col. 2007). La generación de esta diversidad está acoplada al programa de diferenciación de los linfocitos B en la médula ósea que tiene lugar mediante un proceso de recombinación somática específico de secuencia conocido como reordenamiento V(D)J. La VL se genera por recombinación VJ (Figura 4B) y las VH por recombinación VDJ (Figura 4C). Estas combinaciones generan alrededor de 10.000

cadenas posibles. A la diversidad generada por la combinación aleatoria de segmentos hay que sumarle la adición de nucleótidos que ocurre en las regiones de unión de estos segmentos. Una deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) adiciona secuencias cortas durante la recombinación D-J y la unión de V a D-J. Estas adiciones generan la variación observada en los CDR3 de las cadenas pesadas y livianas (Kindt y col. 2007). Estas reacciones de recombinación ocurren en linfocitos de un modo antígeno independiente y llevan a la formación de células B inmaduras que expresan una molécula de IgM en la superficie y que son consecuencia de los reordenamientos de los genes *IgH* e *IgL* que finalizaron con éxito (Kindt y col. 2007).



**Figura 2: Panel A:** Comparación de la estructura de los dominios constante y dominios variable. En el dominio variable se indican los lazos **CDR 1, 2, 3**: región determinante de la complementariedad 1, 2 y 3 y además se puede apreciar los puentes disulfuros intracatenarios (Branden y Tooze 1991). **Panel B:** estructura tridimensional del fragmento variable Fv (VL-VH), las hojas beta en azul y verde representan los FR del dominio variable de la cadena pesada (VH) y dominio variable de la cadena liviana (VL), respectivamente. Los CDRs 1, 2 y 3 aparecen en rosa, azul y amarillo (Kim y col. 2005).



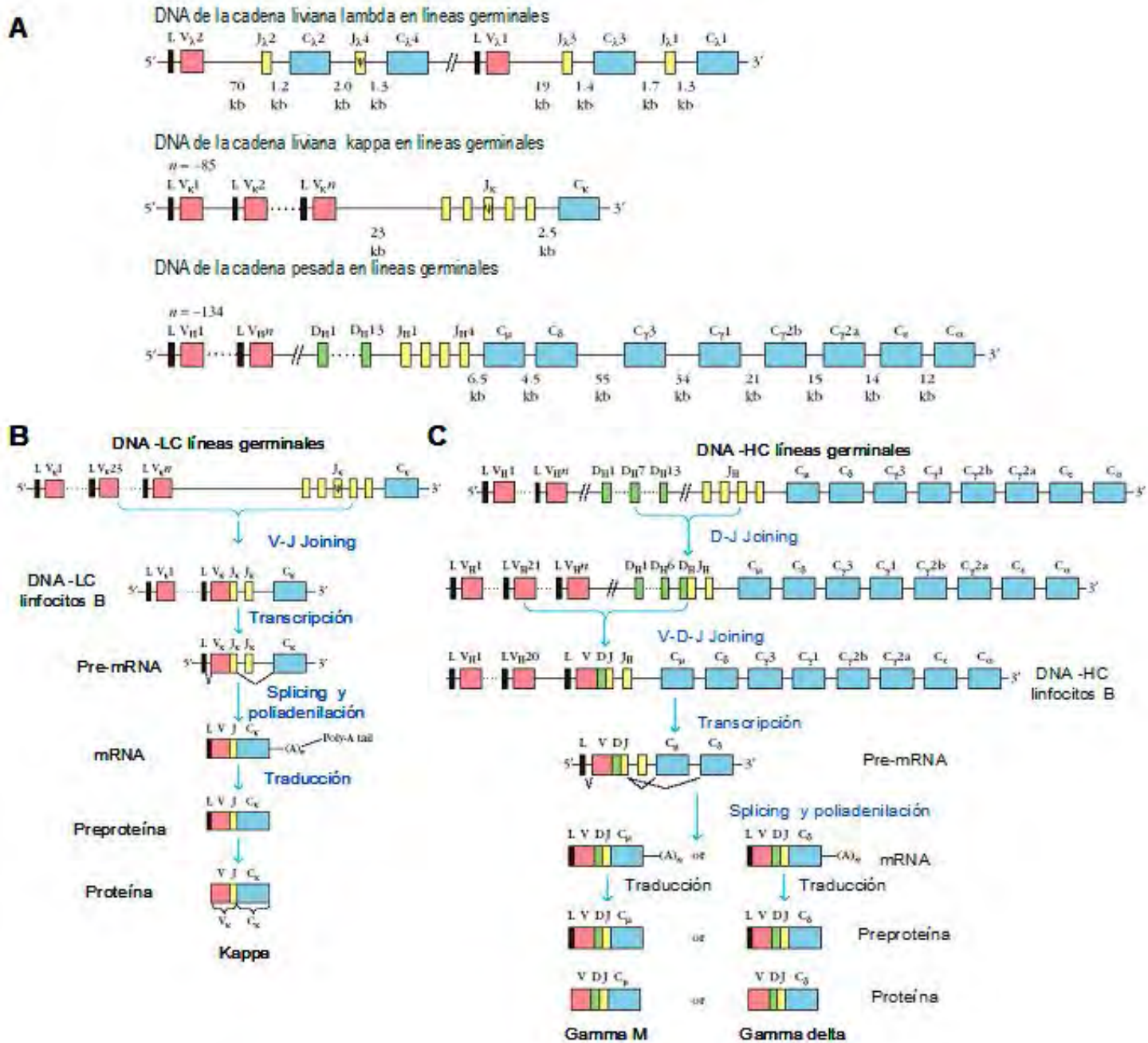
**Figura 3: Representación esquemática de las distintas clases de inmunoglobulinas que pueden obtenerse mediante técnicas de biología molecular. Panel A:** muestra las distintas combinaciones de secuencias murinas con humanas que se realizan para reducir la antigenicidad: quiméricas, humanizadas y humanas. Se aclara el nombre genérico empleado para cada una de las variantes. **Panel B:** fragmentos de anticuerpos. **Abreviaturas:** **Fab:** fragmento de unión al antígeno VL-CL y VH-CH1, **scFv:** anticuerpo simple cadena VL-VH. **Diabody:** anticuerpo biespecífico. **VH:** región variable formada por una sola cadena pesada

Estas células abandonan la médula ósea y son sometidas a un proceso de selección por el cual se convierten en células B maduras o *naive*, que empleando un proceso de *splicing* alternativo co-expresan IgM e IgD en su superficie (Figura 4C). En la periferia, las células B pueden, en respuesta al reconocimiento antigénico y en presencia de una señal co-estimuladora de un linfocito T colaborador, llevar a cabo mecanismos de diversificación adicional: la hipermutación somática y el cambio de isotipo (*class switch recombination*). La hipermutación somática consiste en la introducción de mutaciones puntuales en la secuencia de la región variable de los genes de IgH e IgL (frecuencia de  $10^{-3}$  –  $10^{-4}$ ) que puede dar lugar a una molécula de anticuerpo con mayor afinidad por el antígeno. En este caso las células proliferan y son seleccionadas positivamente, mientras que aquellas en que las mutaciones produjeron un efecto deletéreo, son eliminadas por apoptosis. Este proceso se conoce como maduración por afinidad (Kindt y col. 2007). La mayor parte de estas mutaciones somáticas se observan en los CDRs 1, 2 y 3, ya que mutaciones en las regiones comprendidas entre ellos, las regiones denominadas FR (*framework*) generan más frecuentemente estructuras no funcionales. En las regiones variables de la cadena pesada y liviana, existen cuatro FR, denominados FR1, FR2, FR3 y FR4 que flanquean los CDR1, CDR2 y CDR3 de manera secuencial: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (CDR3 se compone de J o DJ, para las cadenas liviana o pesada, respectivamente).

### **1.3 Clonado molecular de genes de inmunoglobulinas**

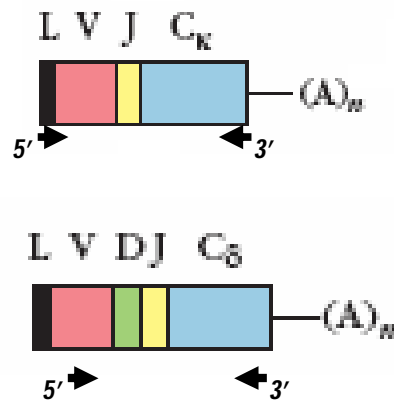
El disponer de información de las secuencias de las líneas germinales V y J de los genes *IgH* e *IgL* inicialmente fue un desafío pero con la finalización de las secuencias de genomas de distintos organismos en la actualidad esta información está disponible.

El clonado molecular de los genes de inmunoglobulinas de un hibridoma, que es un clon productor del anticuerpo con la especificidad buscada, puede realizarse a partir de técnicas de biología molecular. Con esta finalidad, se suelen amplificar las secuencias para generar un Fab o scFv y poder evaluar el reconocimiento del antígeno. Los distintos juegos de primers específicos usados comúnmente se diseñan sobre las regiones más conservadas, tratando de abarcar todos los posibles reordenamientos y de forma tal de que puedan ser expresados de manera funcional en células procariotas. Los primers directos empleados se aparean sobre el inicio de los FR1s de los distintos fragmentos variables de las cadenas pesadas y livianas eliminando la secuencia correspondiente al péptido señal. Debido a la gran cantidad de regiones V, se suele utilizar un número importante de primers directos y los mismos suelen ser degenerados. Los primers reversos empleados generalmente se aparean en la región final de los dominios constantes de la cadena liviana (CL) y del primer dominio constante de la cadena pesada (CH1) o en la región bizagra para las cadenas pesadas (Figura 5).



**Figura 4: Genética de inmunoglobulinas murinas. Parte A:** estructura de los genes de inmunoglobulinas en células germinales. Estos genes están constituidos por un amplio repertorio de segmentos: variable (V), diversidad (D), unión (J, del inglés, Joining) y constantes (C). En ratón los genes de las cadenas livianas de tipo lambda poseen 2V y 4J, mientras que los de las cadenas kappa poseen 85V y 5J. Los genes de las cadenas pesadas poseen 134 V, 13D y 4J, además los segmentos constantes que determinan la funcionalidad de la inmunoglobulina que pueden ser de tipo  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2a,  $\gamma$ 2b,  $\gamma$ 2c,  $\gamma$ 3,  $\epsilon$  y  $\alpha$ . Para que estos genes sean funcionales deben sufrir un proceso de reordenamiento (recombinación somática) que ocurre en linfocitos. **Parte B:** recombinación somática de los distintos segmentos de cadenas livianas, que ocurre por recombinación V- J (V-J Joining). En linfocitos B maduros, los genes reordenados son transcritos y traducidos como muestra el esquema. **Parte C:** recombinación somática de las distintos segmentos de las cadenas pesadas, que ocurre por una primera recombinación D-J (D-J Joining) seguido de una recombinación con la región variable (V-D-J Joining). En los linfocitos B maduros que han sufrido este reordenamientos, los genes de HC son transcritos sufriendo splicing alternativo. Adaptado de Kindt y col. 2007.

El número de primers reversos necesarios para abarcar las distintas variables de los dominios constantes de la cadena pesada y liviana es más reducido. Una vez amplificadas y clonadas las versiones Fab o scFv, se puede proseguir de dos maneras para evaluar la funcionalidad. Por una lado se pueden expresar los Fab o scFv directamente en bacterias o alternativamente fusionados a una proteína de cubierta de fagos (*phage display*). La formación de uniones disulfuro entre cisteínas que forman parte de los FR es esencial para que los fragmentos de anticuerpo se plieguen correctamente por lo que ambas cadenas suelen ser dirigidas al espacio periplásmico, para lo cual se incorporan péptidos señales procariotas (Barbas y col. 2001, Hoogenboom 2002). Este espacio contiene disulfuro isomerasas y chaperonas que ayudan en el plegado de la proteína recién sintetizada. Los rendimientos de producción de anticuerpos en bacterias varían considerablemente y muchas veces pueden mejorarse optimizando los vectores de expresión y las condiciones de fermentación (Horn y col. 1996). También se ha recurrido al empleo de ingeniería de proteínas a los efectos de reemplazar secuencias que no se traducen eficientemente o son inestables en bacterias (Knappik y Pluckthun 1995, Kagler y col. 2009).



**Figura 5: Representación esquemática de los mRNA codificantes para CL y CH y ubicación de los primer empleados para su amplificación por RT-PCR.**

Los juegos de primers específicos usados comúnmente se diseñan sobre las regiones mas conservadas. Los primers directos empleados se aparean sobre el inicio de los FR1s de los distintos fragmentos variables de las cadenas pesadas y livianas eliminando la secuencia correspondiente al péptido señal. Los primers reversos empleados generalmente se aparean en la región final de los dominios constantes de la cadena liviana (CL) y del primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada.

Referencia: L: péptido señal o secuencia *leader*, V: variable, D: diversidad, J: unión, C: constantes, C<sub>κ</sub>: dominio constante kappa de la cadena liviana, C<sub>δ</sub>: los diversos tipos de segmentos constantes de la cadena pesada.

## **2. Los anticuerpos terapéuticos comercializados en la actualidad y la necesidad de mejorar los métodos de producción**

### **2.1 Clases de inmunoglobulinas terapéuticas y sus blancos**

Los anticuerpos han sido llamados balas mágicas por su capacidad de reconocer específicamente los blancos de interés (Gura 2002). Su especificidad los ha transformado en una herramienta invaluable para combatir enfermedades contra las que no existían otros tratamientos disponibles, entre las que se pueden mencionar distintos tipos de cánceres, desórdenes del sistema inmunológico, infecciones de agentes contra los que no existían otros tratamientos efectivos (ejemplo son los agentes virales, etc). Como puede observarse en la Tabla 1 entre los 35 anticuerpos terapéuticos aprobados (o próximos a ser aprobados), 14 de ellos se utilizan para combatir distintos tipos de cánceres (Tabla 1, resaltados en amarillo), 9 mAbs para tratar distintos desórdenes del sistema inmune (Tabla 1, resaltados en celeste). Aunque actualmente sólo hay dos anticuerpos terapéuticos aprobados contra agentes infecciosos: virus del sincitio respiratorio (RSV) y *Bacillus anthracis*, existe un gran número de inmunoglobulinas en distintas etapas de evaluación clínica para combatir HIV; hepatitis B y C, citomegalovirus (Reichert 2007). También hay un gran número de mAbs en distintas etapas de evaluación clínica para tratar cánceres y otros desórdenes del sistema inmune (Nelson y col. 2010). Por otro lado, se están desarrollando anticuerpos para ser utilizados en profilaxis, por ejemplo para impedir la transmisión de los virus del HIV y del herpes simple (Zeitlin y col. 2002). La idea es directamente impedir el ingreso del patógeno tanto a través del tracto genitourinario como gastrointestinal y respiratorio por inmunización pasiva contra aquellos patógenos que no existen vacunas disponibles (Zeitlin y col. 1999). También se han desarrollado anticuerpos contraceptivos.

Una de las desventajas de los anticuerpos terapéuticos es que su actividad específica es baja, comparada con otras proteínas terapéuticas por lo que los tratamientos requieren de gran cantidad de proteína purificada (Satoh y col. 2006). La Tabla 2 muestra por ejemplo que se requieren de 6, 4, 3.5 y 2.5 gramos de anticuerpo por paciente por año en los tratamientos realizados con Erbitux, Rituxan, Herceptina y Enbrel, respectivamente. Este es uno de los motivos que hacen que estas terapias sean tan caras (Stacy 2005, Pollack 2006). Estos cuatro anticuerpos se encuentran en la lista de los diez productos farmacéuticos con mayores ventas a nivel mundial (Tabla 1). La demanda global de algunos de los mAbs aprobados puede superar la tonelada por año. Los anticuerpos monoclonales terapéuticos son actualmente producidos en cultivos de distintas líneas celulares de células de mamíferos (CHOS, NSO, SP2/0, etc) (Tabla 2) y para ello se han instalado grandes fermentadores como los 26 bioreactores de entre 12000-15000L que posee Genentech en USA, lo que le permite generar 2.5 toneladas de anticuerpos monoclonales/año (<http://www.gene.com/gene/news/kits/corporate/manufacturing.html>). El costo de estas instalaciones es

sumamente alto y aunque se han mejorado notoriamente las líneas celulares empleadas, la expresión en este tipo de sistema no es capaz de abastecer la demanda mundial de anticuerpos (Rodrigues y col. 2010, De Jesus y Wurm 2011).

Además de los anticuerpos terapéuticos, están los anticuerpos para diagnóstico biomédico que son inyectables y están marcados con moléculas que permiten su detección. Estos anticuerpos deben ser producidos bajo las normas GMP (*good manufacturing practices*) por lo que también se requiere de una infraestructura especial y de controles muy estrictos para su producción.

Un gran desafío en la producción de inmunoglobulinas terapéuticas completas, es el desarrollo de sistemas celulares que glicosilen de una forma más homogénea y parecida a las células humanas (Raju y col. 2000). Esto ha llevado a que se realice glicoingeniería en los distintos tipos de células empleadas ya sea de mamífero, de levadura y también plantas. En este último caso, recientemente se ha mostrado que la introducción en de las seis enzimas de mamíferos necesarias para la síntesis ácido siálico permite otorgar a estas células la capacidad incorporar el ácido N acetil neurámico correctamente un anticuerpo monoclonal (Castilho y col. 2010).

**Tabla 1: Anticuerpos con aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico aprobados**

Nombre genérico	Nombre Comercial	Blanco	Tipo	Indicaciones	Aprobado EU ( US)	Ventas Billones USD*
<b>Terapéuticos</b>						
Muromonab-CD3	Orthoclone Okt3	CD3	IgG2a murina	Reversión del rechazo trasplante de riñón	1986* (1986)	
Abciximab	Reopro	GPIIb/IIIa	IgG1 quimérica Fab	Prevención de la coagulación en angioplastias	1995* (1994)	
Rituximab	MabThera, Rituxan	CD20	IgG1 quimérica	Linfoma Non-Hodgkin	1998 (1997)	6.7 (2010)
Basiliximab	Simulect	IL2R	IgG1 quimérica	Reversión del rechazo trasplante de riñón	1998 (1998)	
Etanercept	Enbrel	TNF receptor	TNFR-Fc* (CH2-CH3) de IgG1	artritis reumatoidea, psoriasis, espondilitis anquilosante	1998	7.4 (2010)
Daclizumab	Zenapax	IL2R	IgG1 humanizada	Reversión del rechazo trasplante de riñón	1999 (1997)	
Palivizumab	Synagis	RSV	IgG1 humanizada	Prevención de infecciones con RSV (syncytial virus infection)	1999 (1998)	1.1 (2008)
Infliximab	Remicade	TNFa	IgG1 quimérica	Enfermedad de Crohn	1999 (1998)	8.0 (2010)
Trastuzumab	Herceptin	HER2	IgG1 humanizada	Cancer de mama	2000 (1998)	5.5 (2010)
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	CD33	IgG4 humanizada	Leucemia mieloide aguda	NA (2000)	
Alemtuzumab	MabCampath, Campath-1H	CD52	IgG1 humanizada	Leucemia mieloide crónica	2001 (2001)	
Adalimumab	Humira	TNF alfa	IgG1 humana	artritis reumatoidea	2003 (2002)	6.5 (2010)
Alefacept		CD2	CD2-Fc		2003	
Tositumomab-I131**	Bexxar**	CD20	IgG2a murina	Linfoma Non-Hodgkin	NA (2003)	
Efalizumab	Raptiva	CD11a	IgG1 humanizada	Psoriasis	2004 (2003);	
Cetuximab	Erbix	EGF receptor	IgG1 quimérica	Cáncer Colorectal	2004 (2004)	1.6 (2008)
Ibritumomab **	Zevalin**	CD20	IgG1 murina	Linfoma Non-Hodgkin	2004 (2002)	
Omalizumab	Xolair	IgE	IgG1 humanizada	Asma	2005 (2003)	0.5 en US (2010)
Bevacizumab	Avastin	VEGF	IgG1 humanizada	Cáncer Colorectal	2005 (2004)	6.8
Abatacept		CD80/86	CD80786-Fc		2005	
Natalizumab	Tysabri	integrina alfa 4	IgG4 humanizada	Esclerosis múltiple	2006 (2004)	1.1 (2008)
Ranibizumab	Lucentis	VEGF	IgG1 humanizada Fab	Degeneración macular	2007 (2006)	2.3 (2008)
Panitumumab	Vectibix	EGF receptor	IgG2 humana	Cáncer Colorectal	2007 (2006)	



Eculizumab	Soliris	Complemento C5	IgG2/4 humanizada	Hemoglobinuria Paroxysmal nocturna	2007 (2007)	
Rinolaacept		IL1	IL1-Fc		2008	
Certolizumab pegol	Cimzia	TNF alfa	Fab humanizado, pegilado	Enfermedad de Crohn	2009 (2008)	
Golimumab	Simponi	TNF alfa	IgG1 humana	artritis reumatoidea, psoriasis, espondilitis anquilosante	2009 (2009)	
Canakinumab	Ilaris	IL1b	IgG1 humana	Síndrome Muckle-Wells	2009 (2009)	
Catumaxomab	Removab	EPCAM/CD3	Ig2a murina/Ig2b rata bispecifico	Ascitis Malignas	2009 (NA)	
Ustekinumab	Stelara	p40 IL12/23	IgG1 humana	Psoriasis	2009 (2009)	
Tocilizumab	RoActemra, Actemra	IL6R	IgG1 humanizada	artritis reumatoidea	2009 (2010)	
Ofatumumab	Arzerra	CD20;	IgG1 humana	Leucemia linfocita crónica	2010 (2009)	
Denosumab	Prolia	RANK-L;	IgG2 humana	Pérdida de huesos	2010 (2010)	
Belimumab	Benlysta	BLyS	IgG1 humana	Lupus eritematoso sistémico	2011 (2011)	
Raxibacumab	Pendiente	<i>B. anthraxis</i> PA	IgG1 humana	Infección por anthrax	(en revisión)	
Ipilimumab	Yervoy	CTLA-4	IgG1 humana	Melanoma con metastasis	2011 (2011)	
Brentuximab vedotin	Adcetris	CD30	IgG1 quimérica; Inmunconjugada	Linfoma Hodgkin, linfoma de células grandes anaplásticas	En revisión(2011)	
Pertuzumab	Pendiente	HER2	IgG1 humanizada	Cáncer de mama	En revisión	
Alematuzumab	Lymphocide	CD22	IgG humana	Lupus eritematoso sistémico	En revisión	
Zanolimumab	HuMax-CD4	CD4	IgG humana	Cáncer hematológico	En revisión	
Galiximab	Pendiente	CD80	IgG humana	Cáncer hematológico	En revisión	
Palivizumab	Synagis	Proteína F RSV	IgG humanizada	Infección por RSV	En revisión	
Motavizumab	Numax	Proteína F RSV	IgG humanizada	Infección por RSV	En revisión	
Bapineuzumab	Pendiente	$\beta$ amyloid	IgG humanizada	Enfermedad de Alzheimer	En revisión	
Solanezumab	Pendiente	$\beta$ amyloid	IgG humanizada	Enfermedad de Alzheimer	En revisión	
Ocrelizumab	Pendiente	CD20	IgG humanizada	Artritis reumatoidea	En revisión	
<b>Diagnóstico</b>						
Satumomab pendetide	OncoScint	TAG-72	IgG murina 111In	Cáncer colorectal y de ovario	1991	
Arcitumomab	CEA-Scan	CEA	Fab murino 99mTc	Cáncer colorectal	1996	
Capromab pendetide	Prostascint	PSMA	IgG1 murina 111In	Carcinoma de próstata	1996	
Nofetumomab	Verluma	CD20	Fab murino 99mTc	Cáncer de pulmón	1996	

\* Omab: murino, Ximab: quimérico, Zumab: humanizado, Umab: humano

\*Sólo se muestran los valores de los mAbs que se encuentran en la mayor parte del mercado. \*\*Anticuerpos unidos a radionucleótidos. TNF: El factor de necrosis tumoral, EGF: factor de crecimiento epidérmico, VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial. RANKL: molécula necesaria para la diferenciación de los osteoclastos, Amyloid: factores patógenos en la enfermedad de Alzheimer, RSV: virus sincitial respiratorio. En amarillo los anticuerpos para tratar distintos cánceres y en celeste los empleados para tratamientos de desórdenes del sistema inmune. En verde las proteínas de fusión a Fc. Tabla adaptada de <http://www.landesbioscience.com/journals/mabs/about> , Munro y col. 2011 y Aggarwal 2011.

**Tabla 2: Anticuerpos terapéuticos- Sistema de Producción y Fecha de expiraciones de patentes**

Marca	Nombre genérico	Fabricante	Huesped	Dosis Paciente/año (g)	Expiración de patente USA	Expiración de patente EU
Orthoclone OKT3	Muromomab CD3	Johnson & Johnson	hybridoma		expiró	
Zenapax	Daclizumab	Protein Design Labs	CHO		expiró	
Enbrel	etanercept	Amgen		2,5	2011-2019	2015
Vectibix	panitumumab	Amgen	CHO		2010-2017	2011-2016
Rituxan	rituximab	Genentech	CHO	4,3	2013-2019	2013
Herceptin	trastuzumab	Genentech	CHO	3,5	2013-2018	2010-2014
Avastin	bevacizumab	Genentech	CHO		2013-2018	2014
Xolair	omalizumab	Genentech	CHO		2011-2018	2015-2017
Lucentis	ranibizumab	Genentech			2011-2018	2016-2018
Tysabri	natalizumab	Biogen-IDEC	Mouse Myeloma		2013-2018	2016
Zevalin	Ibritumomab tiuxetan	Biogen-IDEC	CHO		2015	2013-2018
Campath	alemtuzumab	Genzyme	CHO		2014-2020	2014
Synagis	palivizumab	Medimmune	NSO		2013-2020	2015
Remicade	infliximab	Johnson & Johnson	SP2/0	1,8	2014	2014
Humira	adalimumab	Abbott	CHO		2017	2018
Erbix	cetuximab	Lilly	CHO	6	2015	2016
ReoPro	abciximab	Centocor/Lilly	SP2/0		2017	Expiró
Soliris	eculizumab	Alexion	NSO		2018	2014
Simulect	basiliximab	Novartis	SP2/0		2018	2011-2015
Mylotarg	gemtuzumab	Pfizer	NSO		2013-2015	2015
Bexxar	Tositumomab	Corixa/SKB	hybridoma			
Raptiva	Efalizumab	Genentech	CHO			

Referencia: en azul se resaltan los anticuerpos que serán producidos por el consorcio argentino.

Fuente: Satoh y col. 2006 y Technology Catalysts International, ©2010

## 2.2 La demanda de producción de anticuerpos completos

Existe una creciente necesidad del desarrollo de métodos alternativos para la producción de anticuerpos completos ya sea tengan aplicaciones en terapia, diagnóstico o bien para purificación. Esta necesidad obedece por un lado a la necesidad de reducir los costos de producción. Por ejemplo, el costo de un tratamiento con avastina supera 100000 USD/paciente/año lo que ha generado mucha controversia (Stacy 2005, Pollack 2006) y lo que determina que aún con políticas de salud públicas adecuadas, sea muy difícil hacer frente a los costos de estos tratamientos. El otro motivo es que los costos de las instalaciones son muy altos y la capacidad instalada no alcanza para producir los anticuerpos monoclonales aprobados (Tabla 1) y en los próximos años se proyectan más de 100 anticuerpos, que actualmente están en etapas II y III de evaluación clínica (Chon y Zarbis-Papastoisits 2012). Las ventas de mAbs terapéuticos excedieron los 40 billones USD a fines del 2010 y la proyección es que alcancen los 70 billones en el 2015 (Chon y Zarbis-Papastoisits 2012). En nuestro país se generó un consorcio público privado que tiene como objetivos por un lado producir cuatro mAbs [Rituximab (CD20), Trastuzumab (EGFr), Bevacizumab (VEGF), Etanercept (TNF)] (Tabla 2, resaltados en celeste) cuyas patentes expiran en los próximos años y por otro lado, desarrollar un mAb para tratamiento de cáncer propio (Racotumomab (NgGM3) (Ciccía 2011). La transformación de estos mAbs en genéricos probablemente contribuya a la reducción del costo del tratamiento, pero la inversión que debe realizarse en las instalaciones para el cultivo de células de mamíferos e insumos requeridos son todavía muy altos para que el costo de producción se reduzca de manera significativa si no se buscan plataformas alternativas de expresión. Además, es necesario avanzar en el desarrollo de métodos más seguros que el uso de cultivo de células de mamíferos, que a su vez permitan la síntesis de moléculas con mayor actividad específica (por ejemplo moléculas obtenidos con técnicas de evolución molecular), moléculas con múltiples funciones (anticuerpos bi o tri específicos) o conjugadas a otras moléculas (toxinas, enzimas, y otras moléculas que faciliten las funciones efectoras, y o detección).

Además de los anticuerpos terapéuticos, los anticuerpos monoclonales son ampliamente utilizados en diagnóstico, en purificación de proteínas e investigación biomédica, representando este grupo también un mercado considerable [superior a los 20 billones USD anuales (Saleem y Kamal 2008)]. Estos anticuerpos son en general producidos en ascitis pero las recomendaciones internacionales apuntan a reducir el uso de animales de laboratorios en estas aplicaciones (Marx y col. 1997). Por lo tanto el desarrollo de sistemas alternativos para la producción de anticuerpos con estas aplicaciones también es de interés y constituye una alternativa para evaluar el desarrollo de nuevas plataformas de expresión.

### 2.3 Las plantas como sistema de expresión alternativa para la producción de anticuerpos

Los mecanismos de síntesis, secreción y modificaciones post-traduccionales de proteínas en plantas son similares a los de las otras células eucariotas lo que permite que se pueda llevar a cabo la producción y ensamblado de proteínas multiméricas, denominadas también proteínas complejas, como los son los anticuerpos en las plantas.

La utilización de plantas ha surgido como una alternativa adecuada a los sistemas actuales de producción de proteínas complejas y, hoy en día, su capacidad de producir proteínas de mamíferos biológicamente activas con bajos costos de producción, mayor seguridad y alta calidad, está bien documentada (Tabla 3) (Obembe col. 2011, Paul y Ma 2011, Sharma y Sharma 2009). Un claro ejemplo de la capacidad que tienen las plantas de ensamblar moléculas complejas es el caso de las inmunoglobulinas A secretorias formadas por cuatro genes diferentes, que en mamíferos son producidas por dos tipos células (células plasmáticas y epiteliales) (Wycoff 2005).

**Tabla 3: Sistemas de expresión alternativos para la síntesis de proteínas complejas.**

	Plantas transgénicas	Células vegetales	Bacterias	Levaduras	células mamíferos	Animales transgénicos
Costos producción	Bajo	Medio	Bajo	Medio	Alto	Alto
Calidad del producto	Alta	Alta	Bajo	Medio	Alto	Alto
Glicosilación	Similar <sup>1</sup>	Similar <sup>1</sup>	Ninguna	Incorrecta	Correcta	Correcta
Riesgo de contaminación	No	No	Si <sup>2</sup>	No	Si <sup>3</sup>	Si <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Glicoingeniería posible, <sup>2</sup> Endotoxinas, <sup>3</sup> Virus priones y DNA oncogénicos.

En particular, el uso de plantas como sistemas de expresión reduciría los costos de producción y permitiría aumentos de escala de manera más sencilla, dado que los procedimientos y la infraestructura utilizados para ello, se basan en los manejos propios de la agricultura. Una ventaja adicional asociada a la producción de proteínas recombinantes en plantas, es la reducción de riesgos asociados a la contaminación por agentes virales, ya que los virus de plantas no son en general peligrosos para la salud humana o animal.

El primer anticuerpo producido en plantas que alcanzó el mercado, es el producido por la empresa cubana Heber Biotec empleado para purificar el antígeno de la vacuna contra la hepatitis B Heberbiovac-HB en junio del 2006 (Kaiser 2008). El empleo de este "planticuerpo" permitió dejar de utilizar 250.000 ratones/año para producir este anticuerpo en ascitis (Mendoza y col. 2009).

### **3. La vía secretoria en células vegetales**

En las células eucariotas, la vía secretoria es el transporte de proteínas a través del sistema de membranas internas que delimitan distintos compartimientos dentro de la célula, excluyendo plástidos y mitocondrias, a menudo es denominado "sistema de endomembranas". El mismo está compuesto por compartimientos específicos, los cuales están principalmente especializados en la producción y maduración de proteínas, su almacenamiento, degradación y reciclado. En términos generales los compartimientos que constituyen el sistema de endomembranas son: el retículo endoplasmático (ER), el complejo del Golgi (G), la red trans-Golgi (TGN, *trans Golgi network*)/endosomas tempranos (EE, early endosomes), membrana plasmática y las células vegetales contienen además, tres tipos de vacuolas: vacuola de reserva (PSV), vacuola lítica (LV) y la vacuola central (CV) y compartimientos pre-vacuolares/cuerpos multivesiculares (PVC/MVB).

#### **3.1 Las células vegetales presentan vacuolas de distintas características**

Las vacuolas son un compartimiento clave para la célula vegetal, pues intervienen en un gran número de funciones esenciales como por ejemplo el mantenimiento de la turgencia, de la homeostasis protoplasmática y el almacenamiento de metabolitos secundarios y proteínas que al ser degradadas son utilizadas como fuente de carbono, nitrógeno y azufre, tanto para los procesos de crecimiento como de desarrollo de la planta (Marty y col. 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. La biogénesis de vacuolas y el transporte de proteínas y otros componentes a las mismas es un proceso complejo dado que en estas células coexisten vacuolas líticas y de reserva y además se observan diferencias cuando se estudia este proceso en distintas especies y tejidos (Herman y Larkins 1999, Bethke y Jones 2000, Vitale y Hinz, 2005, Petruccelli y col. 2006, Zouhar y Rojo 2009). Por otro lado es de destacar que el proceso de transporte a vacuolas líticas y de reserva se encuentra muy coordinado con los procesos de secreción y endocitosis, interviniendo un gran número de genes lo que dificulta el estudio (Rojo y Denecke 2008). Aunque numerosos esfuerzos se han realizado en entender el funcionamiento del sistema vacuolar, los mecanismos moleculares involucrados en reconocimiento de la carga y la maquinaria implicada en este reconocimiento y posterior transporte se conocen escasamente quedando todavía un amplio camino a ser recorrido y que requerirá de aproximaciones menos reduccionistas que permitan tener una visión de todo el sistema en conjunto (Hinz y col. 2007, Jolliffe y col. 2005, Rosado y Raikhel 2010, Niemes y col. 2010a). A continuación se describen algunas de las características de las vacuolas vegetales, vías de transporte y maquinaria molecular que interviene en el proceso de transporte a vacuolas.

Las vacuolas pertenecen al sistema de endomembrana de la vía secretoria y en células vegetales se han descrito tres tipos de vacuolas: vacuola de reserva (PSV), vacuola lítica (LV) y la vacuola central híbrida (CV). También se han descrito vacuolas asociadas a senescencia (Otegui y col. 2005). Aunque una de las formas de distinguir las distintas vacuolas era a través del análisis del tipo de acuoporina (TIP, *tonoplast intrinsic protein*) presente en su tonoplasto: gamma TIP para la LV y alfa/delta TIP para las PSV, se ha mostrado que el tipo de acuoporina presente en el tonoplasto varía en las distintas especies (Bethke y Jones 2000) y además que cambia con el estado de desarrollo de la planta (Gattolin y col. 2010) por lo que aún hoy sigue siendo un desafío establecer la identidad de una vacuola. Se cree que las LV son análogas al lisosoma de mamíferos y a la vacuola de levaduras y que intervienen en los procesos de degradación en células vegetativas. Las PSV sirven como el principal sitio de almacenamiento de proteínas y minerales y han sido descritas principalmente en cotiledones y endosperma de semillas (Hoh y col.1995, Paris y col.1996, Vitale y Raikhel 1999, Herman y Larkins 1999). Aunque inicialmente se creía que las PSV eran típicas de semilla, la coexistencia de LV y PSV en una misma célula fue descrita en células de punta de raíz de arveja (Paris y col. 1996), luego en aleurona en semillas de cereales (Swanson y col. 1998) y en células de mesófilo de hoja de tabaco (Di Sansebastiano y col. 1998). En cambio, en algunas especies como por ejemplo *Arabidopsis* se postula la existencia de una sola clase de vacuolas (Gattolin y col. 2010). La vacuola central híbrida, encontrada en la mayoría de las células de tejidos diferenciados se generaría por fusión de LV y PSV y poseería características funcionales de ambos compartimientos, conteniendo proteínas digestivas y de reserva (Neuhaus y Martinoia 2011).

### **3.2 Las rutas de transporte a vacuolas**

El transporte de proteínas solubles y de membranas entre los compartimientos del sistema de endomembranas 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 Golgi, denominadas COP's (COP-I y COP-II, *coat protein complexes* I y II, respectivamente) o también, las encargadas del transporte desde estos compartimientos 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 y col. 1998) y, las vesículas densas (DV, *Dense Vesicles*) (Hillmer y col. 2001), entre otras (Vitale y Hinz 2005).

Todas las proteínas de la vía secretoria son sintetizadas por ribosomas asociados al ER ingresando a los compartimientos del sistema de endomembranas. Estas proteínas pueden alcanzar diferentes destinos: ER, Golgi, compartimientos prevacuolares, endosomas, vacuolas, membrana plasmática, secreción (Figura 6). El transporte desde el ER hacia el *cis*-Golgi es mediante las vesículas COPII (transporte anterógrado),

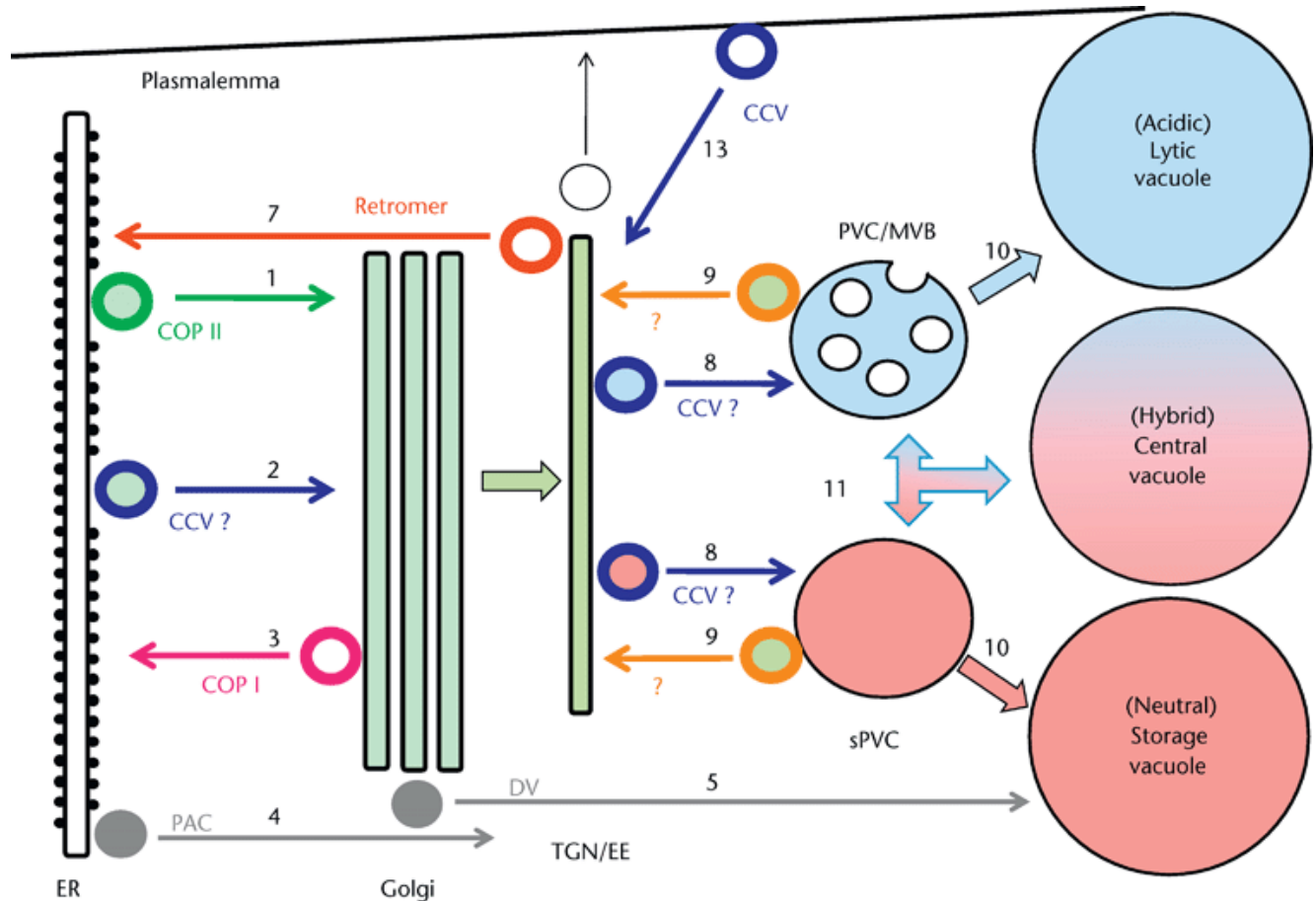
mientras que las vesículas COPI transportan proteínas desde el cis Golgi al ER (transporte retrógrado). Una vez en el Golgi el paso del cis, al medio y trans es explicado a través de dos modelos diferentes: el modelo del transporte vesicular o bien el modelo de maduración de la cisterna (Alberts y col. 2008). El destino final de una proteína en la vía secretoria depende de señales de direccionamiento presentes en su estructura primaria que son reconocidas por la maquinaria de transporte y también de un correcto plegamiento ya que debe superar los mecanismos de control de calidad (Alberts y col. 2008).

Las vías de transporte a vacuolas líticas o de reserva involucran compartimientos PVC de diferentes características. En células que contienen una única clase de vacuolas se cree que las proteínas con señales hacia las vacuolas líticas y de reserva transitarían a través del mismo compartimiento prevacuolar (PVC/MVB) (Otegui y col. 2006, Neuhaus y Martinoia 2011). En cambio, habría un compartimiento prevacuolar específico de reserva (sPVC, storage prevacuolar compartment) identificado en semillas en desarrollo de arroz, arroz y en células BY2 (bright yellow) de tabaco y *Arabidopsis* (Shen y col. 2011), que se presentará en más detalle en la sección 3.5.2.

El transporte a vacuolas líticas es mediado por vesículas CCV que se originan en el TGN y se cree que depositarían su contenido dentro de los compartimientos pre-vacuolares PVC/MVB (Neuhaus y Martinoia 2011).

El transporte de proteínas a PSV, a diferencia del transporte a LV, involucra vesículas de distintas características. En semillas en desarrollo de zapallo se encuentran las vesículas PAC (Precursor Accumulating Vesicles) que transportan precursores de proteínas de reserva directamente desde el ER a PSV (Hara-Nishimura y col.1998). Estas vesículas están cubiertas de ribosomas (Hara-Nishimura y col.1998). Como las PAC contienen glicoproteínas derivadas de Golgi se ha sugerido que las vesículas PAC podrían reclutar selectivamente componentes provenientes del Golgi (Hara-Nishimura y col.1998). En semillas en desarrollo de otras dicotiledóneas como por ejemplo arveja, se describieron que las vesículas densas DVs (dense vesicles) que emergen del complejo de Golgi *cis*- o *medio* y transportan las proteínas de reserva a PSV (Hillmer y col. 2001). En tabaco se ha descrito otro tipo de vesículas involucradas en el transporte de proteínas a PSV, las vesículas DIP (*dark intrinsic protein*), que poseen la acuoporina DIP en su membrana y de ahí su nombre (Jiang y col. 2000, Jiang y col. 2001). En semillas en desarrollo de soja se han descrito vesículas transportando proteínas de reserva que se desprenden tanto del ER como del Golgi dependiendo de las características de solubilidad de la familia de proteína de reserva (Mori y col. 2004). Hay dos hipótesis para explicar el destino final de las DVs, la más simple establece que se fusionarían directamente al PSV, mientras que la otra propuesta establece que formarían los cuerpos multivesiculares (MVBs, multivesicular bodies) que actuarían como el compartimiento prevacuolar de reserva. Los MVBs están presentes en todas las células eucariotas y están involucrados en varios procesos post-Golgi de la vía secretoria, incluida la

endocitosis (Reyes y col. 2011). Los MVB se caracterizan por contener estructuras de vesículas dentro de vesículas de ahí su nombre.



**Figura 6: Biogénesis vacuolar en plantas.** Compartimentos de la vía secretoria: retículo endoplasmático (RE), Golgi, transGolgi/endosomas tempranos (TGN/EE), compartimentos pre-vacuolares/cuerpos multivesiculares (PVC/MVB), compartimentos pre-vacuolares de reserva (sPVC), membrana plasmática, y tres tipos de vacuolas: vacuola de reserva (PSV, salmón), vacuola lítica (LV, celeste) y la vacuola central híbrida. La vía del RE hacia el Golgi involucra (1) vesículas COPII, (2) COPII-independiente (CCV?). El transporte retrogrado del Golgi al RE involucra (3) COP I. El transporte de proteínas a vacuolas de reserva en semillas involucra (4) vesículas densas precursoras de almacenamiento (PAC) formadas desde el RE saltando el Golgi, o (5) vesículas densas (DV) formadas desde el cis o medial Golgi. El transporte del Golgi al TGN es probablemente un proceso de maduración que conduce a la separación del aparato de Golgi (6). El transporte retrogrado del TGN hacia el RE es mediado por el retrómero (7). El transporte del TGN hacia cualquiera de los PVC es mediado por CCV (?) (8). El transporte retrogrado (reciclado) del PVC al TGN es mediado por mecanismos desconocidos (9). El transporte de PVC hacia vacuolas se cree que es mediado por la fusión directa una vez que el proceso de maduración del PVC terminó (10). La mayoría de las células, que poseen una sola vacuola central, el mismo PVC puede ser utilizado para transportar ambos tipos de proteínas vacuolares (11). El camino *default*, seguido por proteínas solubles, transportadas desde el TGN hacia la membrana plasmática a través de vesículas secretorias (12). Proteínas endocitadas son transportadas del CCV al TGN/EE (13). Tomado de Neuhaus JM y Martinoia E. 2011. Plant Vacuoles



### 3.3 Señales de direccionamiento vacuolar de proteínas “carga” solubles

El modelo más aceptado sobre el transporte de proteínas solubles en la vía secretoria de células vegetales establece que el destino *default* de proteínas que ingresan a la vía secretoria y no poseen ninguna otra señal de direccionamiento es la secreción (Denecke y col. 1990, Crofts y col. 1999, Phillipson y col. 2001). En este contexto, el transporte de proteínas solubles a vacuolas requiere de un mecanismo que seleccione a las proteínas carga y las desvíe del camino *default*. En mamíferos, los residuos de manosa-6-fosfato sobre proteínas carga son críticos para el tráfico hacia el lisosoma (Kornfeld 1987, 1992; Le Borgne & Hoflack 1998), mientras que en plantas ningún N-glicano se requiere para el reconocimiento de proteínas vacuolares por la maquinaria de transporte (Neuhaus & Rogers 1998). Aunque levaduras y células animales en general no son un buen sistema para estudiar los determinantes de direccionamiento vacuolar de proteínas vegetales debido a que en plantas no interviene el receptor de la manosa 6 fosfato, las primeras señales de direccionamiento vacuolar vegetales fueron determinadas utilizando levaduras. Así, por análisis de delección y mutación y expresión en levadura de propépticos de las enzimas carboxipeptidasa Y (CPY) y proteinasa K se identificaron las primeras secuencias importantes para el direccionamiento vacuolar (Johnson y col.1987; Klionsky y col.1988; Valls y col.1990). Estos resultados, en combinación con la observación de propéptidos C-terminales encontrados únicamente en las formas vacuolares de  $\beta$ 1,3-glucanasa en tabaco (Shinshi y col.1988; Neale y col.1990), permitieron la descripción de la primera señal de direccionamiento vacuolar propeptídica (CTPP) identificada en la lectina de cebada (Bednarek y col.1990). Una segunda señal de direccionamiento se informó poco después en propéptidos N-terminales no glicosilados (NTPP) de esporamina de batata (Matsuoka & Nakamura 1990). Actualmente, un gran número de secuencias involucradas en el direccionamiento vacuolar proteico han sido caracterizadas en la literatura, y estas han sido clasificadas en varios grupos de acuerdo con su función y homología con otras señales (Neuhaus & Rogers 1998). Las señales de direccionamiento vacuolares (VSS, *vacuolar sorting signals*) se clasifican en: determinantes secuencia-específica (ssVSS: *sequence specific VSS*), secuencias C-terminales (ctVSS *C-terminal determinants VSS*), y/o determinantes físicos (psVSS: *physical structure VSS*) (Matsuoka & Neuhaus, 1999; Vitale & Raikhel, 1999). Algunos ejemplos son detallados en la Tabla 4. Los resultados obtenidos hasta ahora en células vegetales muestran que proteínas que carecen de señales específicas de direccionamiento son secretadas (Denecke y col. 1990, Vitale y Raikhel 1999) y que el proceso de transporte a vacuolas es saturable lo que sugiere que existiría un factor limitante como por ejemplo un receptor que participaría en el proceso de direccionamiento (Frigerio y col. 1998)

El reconocimiento de los VSS presentes en la proteína vacuolar por receptores de direccionamiento anclados en las membranas del ER y/o aparato de Golgi induciría cambios de conformación que determinan

el reclutamiento de proteínas que provocan la formación y liberación de vesículas como se detallará en la sección 3.5.

### 3.3.1 Señales secuencias específicas (ssVSS)

Las señales de direccionamiento vacuolar secuencia-específicas (ssVSS) que comparten una secuencia conservada NPIXL o NPIR usualmente residen en los propéptidos localizados en el extremo amino-terminal (pero también funcionan en posiciones internas o carboxilo terminales) y la presencia del residuo Leu o Ile es crucial para este direccionamiento (Matsuoka y Nakamura 1999). La señal de ssVSS mejor estudiada fue en la proteína de reserva esporamina, identificando el propéptido a 16 residuos del amino-terminal, clivado una vez que ingresa a la vacuola tubérculos de batata (Matsuoka y col. 1990) y en la aleuraina de cebada que es una proteasa presente en la vacuola lítica. El rol específico del propéptido fue reforzado cuando se observó el direccionamiento vacuolar incluso cuando se ubicaba en el C-terminal (Koide y col. 1997) y por la conservación de secuencia en otros miembros de la familia de esporamina. La presencia de una isoleucina en el NPIR es esencial para el direccionamiento y la unión en ensayos *in vitro* a receptores putativos, sugieren que su cadena lateral hidrofóbica es crucial en la participación de la interacción (Matsuoka & Nakamura, 1999).

El primer ejemplo de un propéptido interno que funcionaría como VSS fue descrito en la ricina, una proteína de reserva heterodimérica abundante en el endosperma de semillas de ricino (*Ricinus communis L.*). Por mutagénesis delecional se mostró que la señal de direccionamiento vacuolar se encuentra en un propéptido linker de 12 aminoácidos, y no en el extremo N-terminal del propéptido y al llegar a la vacuola este linker se cliva (Frigerio y col. 1998, Jolliffe y col. 2006). Este propéptido linker presenta una secuencia consenso presente en los ssVSS con residuo crítico isoleucina (Frigerio y col. 2001). Como corresponde para este tipo de señales de direccionamiento, el propéptido linker también demostró su funcionalidad en distintas posiciones de la secuencia primaria de la proteína (Frigerio y col. 2001, Jolliffe y col. 2003). La importancia de la isoleucina en esta señal interna fue demostrada ya que mutaciones en este residuo aminoácido del motivo NPIR afectan el direccionamiento vacuolar tanto de la proricina y como del heterodímero (Frigerio y col. 2001, Jolliffe y col. 2003).

### **3.3.2 Señales C-terminales (ctVSS)**

Las señales de direccionamiento ubicadas en el extremo carboxilo terminal (ctVSS), se caracterizan por no poseer similitud en su composición aminoacídica ni en su longitud siendo su única característica común la presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos y que para funcionar deben estar accesibles en el extremo carboxilo terminal de la proteína ya que el agregado de aminoácidos en este extremo elimina su funcionalidad (Matsuoka y Neuhaus 1999, Vitale y Hinz 2005).

La primera señal de esta clase fue identificada en la faseolina que es una glicoproteína de reserva del poroto común. La delección de los últimos cuatro aminoácidos del propéptido (AFVY) suprime el direccionamiento vacuolar, causando que una fracción de las moléculas de faseolina $\Delta$ AFVY se secreten (Frigerio y col. 1998), indicando que la secuencia eliminada contiene la información necesaria para el direccionamiento vacuolar. Sin embargo estudios posteriores mostraron que una fracción de la faseolina $\Delta$ AFVY es transportada a vacuolas, explicándose este hallazgo tanto porque esta proteína forma trímeros (formados por moléculas con y sin AFVY) como así también por la presencia de señales múltiples (Frigerio y col. 2001, Foresti y col. 2003). Ensayos bioquímicos y de microscopia demuestran que el tetrapéptido AFVY cuando es fusionado a una proteína fluorescente, como GFP, inhibe su secreción y permite su acumulación en vacuolas (Frigerio y col. 2001). Esto demuestra de nuevo, que el tetrapéptido contiene la información suficiente para el direccionamiento vacuolar.

### **3.3.3 Señales físicas (psVSS)**

La tercera clase de señales de direccionamiento vacuolar corresponde a las de determinantes físicos (psVSS). La estructura tridimensional proteica demostró contener dominios responsables del direccionamiento vacuolar, como en el caso de la fitohemaglutinina (von Schaewen & Chrispeels 1993), y proteínas de reserva de la familia de las globulinas 11S y 7S, llevando a la hipótesis de que la interacción con el receptor depende de determinantes presentes en la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria (Matsuoka & Neuhaus 1999). En este caso, las señales internas están menos definidas y se ha sugerido que su rol en la agregación podría ser el responsable del direccionamiento vacuolar (Holkeri y Vitale 2001, Maruyama y col. 2006, Neuhaus y Rogers 1998, Petrucci y col. 2007).

**Tabla 4: Señales involucradas en el direccionamiento vacuolar de proteínas solubles.**

	PROTEINA	SECUENCIA			VACUOLA	REFERENCIA
ssVSS	Esporamina	RFNPIRLPTTHEPA	N-terminal	N+S	LV	Matsuoka y col. 1990
	Aleuraina	SSSSFADSNPIRVTDRAAST	N-terminal	N+S	LV	Holwerda y col. 1992
	Ricina	SLLRPWPNFN	Interno	N+S	PSV	Frigerio y col. 2001
	Albumina 2S ( <i>Ricinus communis</i> )	STGEEVLRMPGDEN	Interno	N+S	PSV	Jolliffe y col. 2003
	Globulina 11S	GNIFRGF	Interno	S	CV	Petrucelli y col. 2007
ctVSS	Lectina	VFAEAIANSTLVAE	C-terminal	N+S	PSV	Bednarek y col. 1990
	Quitinasa A	GLLVDTM	C-terminal	N+S	PSV	Neuhaus y col. 1991
	Faseolina	AFVY	C-terminal	N+S	PSV	Frigerio y col. 1998
	Albumina 2S (Brazil nut)	PSRCNLSPMRCPMGGSIAGF	C-terminal	N+S	PSV	Saalback y col. 1996
	Fitepsina	ILGDVFMGPYMTVFYDYGKLRIGFAKAA	C-terminal	S	PSV	Hadlington (PhD thesis) 2000
	b-conglicina (subunidad $\alpha'$ )	PLSSILRAFY	C-terminal	N+S	PSV	Nishizawa y col. 2003
	Globulina 11S	KISIA	C-terminal	S	CV	Petrucelli y col. 2007
psVSS	Legumina	(Dominios multiples)	Interno	S	PSV	Saalback y col. 1991
	Fitoheماغlutinina	(loop interno)	Interno	N	PSV	Von Schawen & Chrispeels 1993
	Fitepsina	(loop interno)	Interno	N	PSV	Törmäkangas y col. 2001

**Referencias:** Las secuencias descritas en verdes pertenecen a propéptidos. Las señales que se han demostrado ser necesarias (N) y suficientes (S) para el direccionamiento vacuolar se etiquetan como "N+S". La localización subcelular nativa: PSV (*proteins storage vacuoles*) o LV (*lentic vacuoles*). VSS (*vacuolar sorting signals*): señales de direccionamiento vacuolar; ssVSS (*sequence specific VSS*): determinantes secuencia específica; ctVSS (*C-terminal determinants VSS*): secuencias C-terminales; psVSS (*physical structure VSS*): determinantes físicos en proteínas de reserva.

### 3.4 Señales de direccionamiento vacuolar de proteínas "carga" de membrana

Con relación al transporte de proteínas de membranas en la vía secretoria se debe tener en cuenta que el movimiento de lípidos y proteínas es muy dinámico, lo que ha dificultado interpretar y dilucidar las bases de este tipo de tránsito. Se mostró que dominios transmembranas de diferentes longitudes: 23, 20 y 17 residuos (TM23/TM20/TM17), conferían a una proteína reportera distintos patrones de localización lo que sugirió que la localización final dependía de la longitud del dominio TM (Brandizzi y col. 2002). Posteriormente se mostró que proteínas de membrana residentes tanto en el RE como en el aparato de Golgi poseen además de los dominios transmembrana (ya sean de tipo I o II), secuencias del lado citosólico que son necesarias para determinar su localización (Contreras y col. 2004, Boulaflous y col. 2009). Algunas proteínas de membrana de tipo II de localización vacuolar son transportadas directamente desde el ER a vacuolas en un proceso muy rápido y una vez alcanzada la vacuola sufren un proceso de internalización siendo requerida la secuencia PIEPPHH presente en la cola citosólica. Otras proteínas vacuolares con dominio

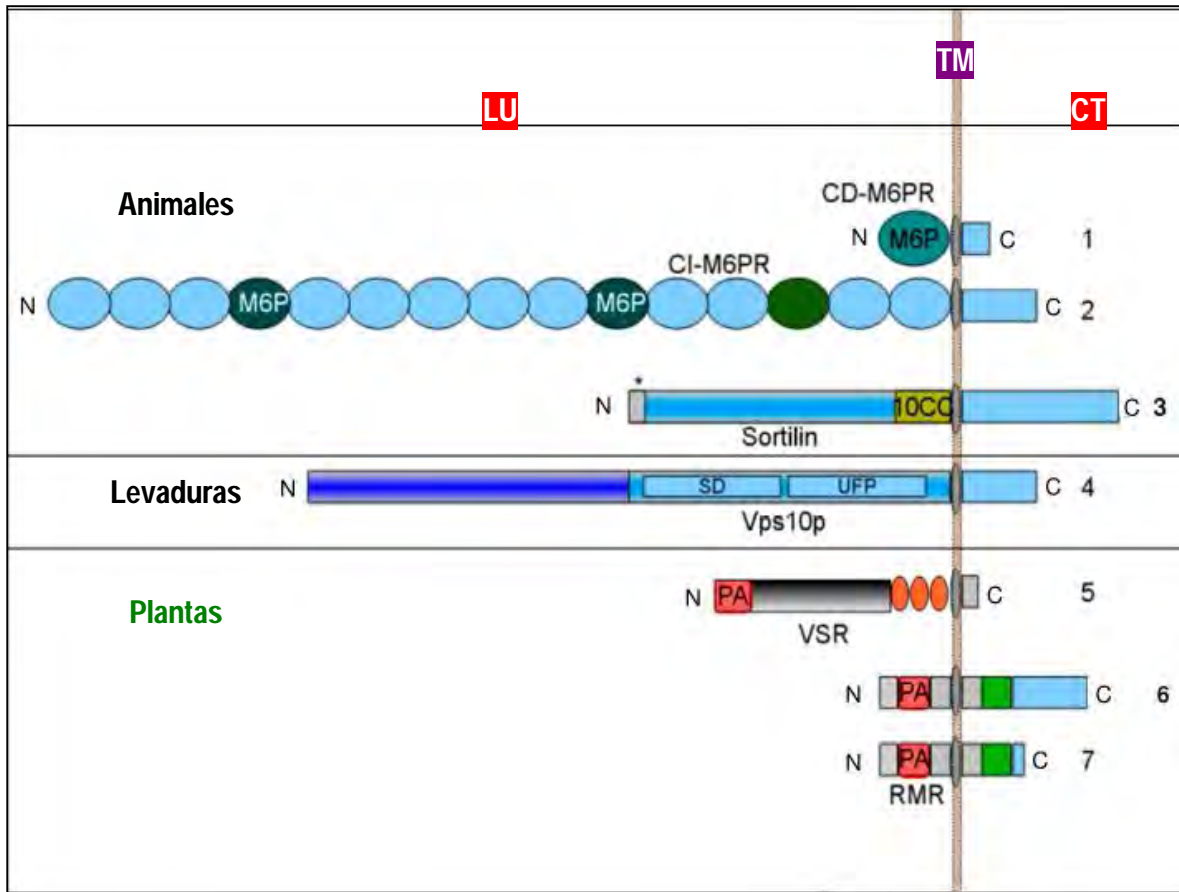
transmembrana no sufren internalización (Oufattole y col. 2005). Por último, el transporte de proteínas carga solubles y de membrana poseen sensibilidad diferencial a los inhibidores brefeldina A y monensina lo que indica que la maquinaria interviniente en estos procesos es diferente (Oufattole y col. 2005).

### **3.5 Los receptores putativos de direccionamiento vacuolar**

Existen dos familias de proteínas que han sido propuestas como receptores de direccionamiento vacuolar cuya interacción con distintos VSSs ha sido demostrada *in vitro* e *in vivo* (Shimada y col. 2003, Miao y col. 2006, Wang y col. 2011). Por un lado, se describen los VSRs (*vacuolar sorting receptors*) que poseen motivos similares al factor de crecimiento epidérmico (*EGF-like motifs*) (Ahmed y col. 2000) y por otro lado, los RMR (*receptor-transmembrane sequence-RING-H2, RING, Really Interesting New Gene Zinc Finger Motif*) que contiene un motivo dedos zinc (Jiang y col. 2000) (Figura 7). Los ligandos nativos de la mayoría de los VSRs y RMRs aún no han sido completamente identificados y caracterizados en plantas (Suen y col. 2010). Además, la participación y funcionalidad de ambos receptores en las vías de direccionamiento a vacuolas líticas o de reserva, han sido objeto de muchas controversias, y recientemente se han propuesto mecanismos de direccionamiento y tráfico para ambos receptores divergentes (Linz y col. 2007, Craddock y col. 2008, Zouhar y col. 2010, Wang y col. 2011).

#### **3.5.1 La familia de receptores de direccionamiento vacuolar VSR**

El primer VSR fue identificado en CCV de arveja y debido a su tamaño molecular se lo denominó BP-80 (Kirsch y col. 1994). Posteriormente se identificó el homólogo de arabidopsis que fue denominado AtELP (*Arabidopsis thaliana Epidermal Growth Factor like protein*) (Cao y col. 2000) cuyo nombre fue cambiado posteriormente a AtVSR1 (Shimada y col. 2003). También se aisló, pero a partir de vesículas PAC un homólogo de zapallo que fue llamado, PV72 (Shimada y col. 2002). Aunque PV72 posee varios motivos EGF que interactuarían con las proteínas carga de manera pH dependiente similar a lo que ocurre con los AtVSRs, este receptor posee también un motivo EGF de interacción con calcio que ha sido postulado como importante en el transporte a PSV (Watanabe y col. 2002). Se ha mostrado además que PV72 intervendría en el transporte a PSV (Watanabe y col. 2002). Un homólogo de PV72 interviene en el transporte de proteínas de reserva de girasol (Molina y col. 2006) e interactúa también en forma calcio dependiente con VSS (Petruccelli y col. 2007). En el genoma de arabidopsis se encuentran siete VSR (Shimada y col. 2003, Miao y col. 2006).



**Figura 7: Comparación de las estructuras de las familias de receptores vacuolares en distintos organismos.** LU: región luminal, sobre la izquierda; TM: región transmembrana, línea marrón; CT: región citosólica, sobre la derecha. (1)-(4) Los receptores típicos en animales y levaduras. (5) Las proteínas VSR. (6) Las proteínas AtRMR2, AtRMR3 y AtRMR4 poseen una cola citosólica más extensa. (7) Las proteínas AtRMR1 y AtRMR5. El dominio PA en la región luminal está representado con un rectángulo rojo. Las tres repeticiones EGF se muestran con óvalos naranjas. El dominio RingH2 en la región citosólica se muestra como rectángulo verde.

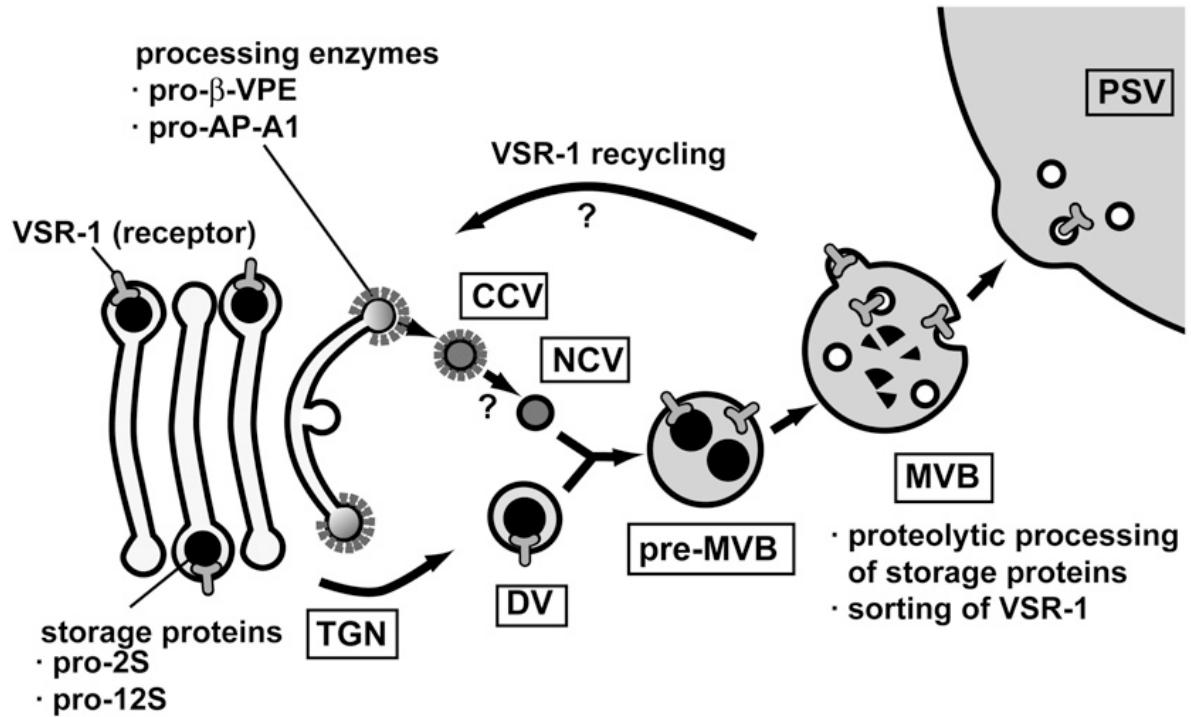
Las proteínas VSR se caracterizan por tener un péptido señal, un dominio luminal (LU) compuesto por un dominio PA (asociado a proteasa) (Mahon y Bateman 2000) y repeticiones EGF (*epidermal growth factor*) que reconocerían a la molécula carga (Cao y col. 2000), un único dominio transmembrana (TM) y una cola citosólica (CT) que interviene en el reclutamiento de la maquinaria que participa en el transporte vesicular (daSilva y col. 2006, Saint-Jean y col. 2010).

El primer VSR estudiado: el BP80 de arveja tiene la habilidad de unirse a las secuencias ssVSSs de los propéptidos de las proteínas líticas aleuraina y esporamina de una manera pH dependiente (Kirsch y col. 1994) y también a las secuencia ctVSS de la proteína de reserva albúmina 2S de nuez de Brasil (Kirsch y col. 1996). La participación de los VSR en el transporte de proteínas solubles a compartimientos prevacuolares líticos y vacuolas líticas ha sido bien caracterizada (Li y col. 2002). Posteriormente, se demuestra el papel de los VSR en el transporte de proteínas reserva (Shimada y col. 2003, Otegui y col. 2006). En embriones en desarrollo de arábidopsis, se observa que los VSRs participan en el transporte de proteínas de reserva en DV que se fusionan con vesículas que transportan proteasas de procesamiento vacuolar formando cuerpos multivesiculares, que luego se transforman en PSV (Figura 8) (Otegui y col. 2006). Por otro lado, el análisis en plantas de arábidopsis *knock-out* para AtVSRs mostró un tráfico defectuoso de proteínas de reserva a PSV en semillas y una parcial secreción de las mismas (Zouhar y col. 2010). También se mostró que los VSR1, VSR3 y VSR4 de arábidopsis, son responsables de direccionar a vacuolas de reserva, tanto en semillas como en tejido vegetativo, las distintas formas polimórficas de las globulinas de reserva 12S y albúminas 2S (Zouhar y col. 2010). A partir de estos datos experimentales disponibles, se demuestra contundentemente que las proteínas VSR participan en el transporte de proteína a vacuolas líticas y de reserva. También se ha mostrado un rol de los VSR en la movilización de proteínas de reserva durante la germinación (Wang y col. 2007).

El estudio de la localización subcelular de los AtVSRs muestra que se encuentran en el trans-Golgi (TGN) y compartimientos prevacuolares (PVC) en Arabidopsis (Sanderfoot y col. 1998), esta distribución es consistente con la función de intervenir en el transporte de proteínas a vacuolas líticas, dado que las vesículas CCV se generan del *trans-golgi* hacia los compartimientos pre-vacuolares/cuerpos multivesiculares. Los siete AtVSR presentan un patrón de distribución similar en células BY2 ubicándose en compartimientos prevacuolares (Miao y col. 2006). Por otra parte, se ha demostrado que las proteínas AtVSRs reciclan mediante un transporte retrógrado lo que les permitiría participar en más de una ronda de direccionamiento y se cree que los VSRs reciclaban desde los compartimientos pre-vacuolares/ cuerpos multivesiculares en protoplastos de tabaco y arábidopsis (daSilva y col. 2005, Olviusson y col. 2006). Sin embargo, ensayos recientes en protoplastos de tabaco y arábidopsis mostraron que el receptor VSR reconocería sus ligandos: GFP-esporamina y aleuraina-GFP, en el lumen del ER (Niemes y col. 2010a) y el complejo ligando-receptor avanzaría desde el ER hacia el *trans-golgi*, y posteriormente luego de liberados los ligandos, los VSRs reciclan mediante un transporte retrógrado desde el *trans-golgi* al ER (Niemes y col. 2010b) (Figura 9). El mecanismo de reciclado del AtVSR es mediado por el retrómero (complejo multiproteico que se ensambla en una cobertura de la membrana del endosoma y que se une directamente a la porción citoplasmática del receptor, y a la bicapa lipídica) del que forman parte las nexinas de direccionamiento: SNX1 y SNX2a (*sorting nexin 1* y *2a*, respectivamente). Las proteínas cargo vacuolares continúan desde el *trans-golgi* hacia la vacuola de una manera independiente del receptor desconocida (Niemes y col. 2010b). El modelo propuesto

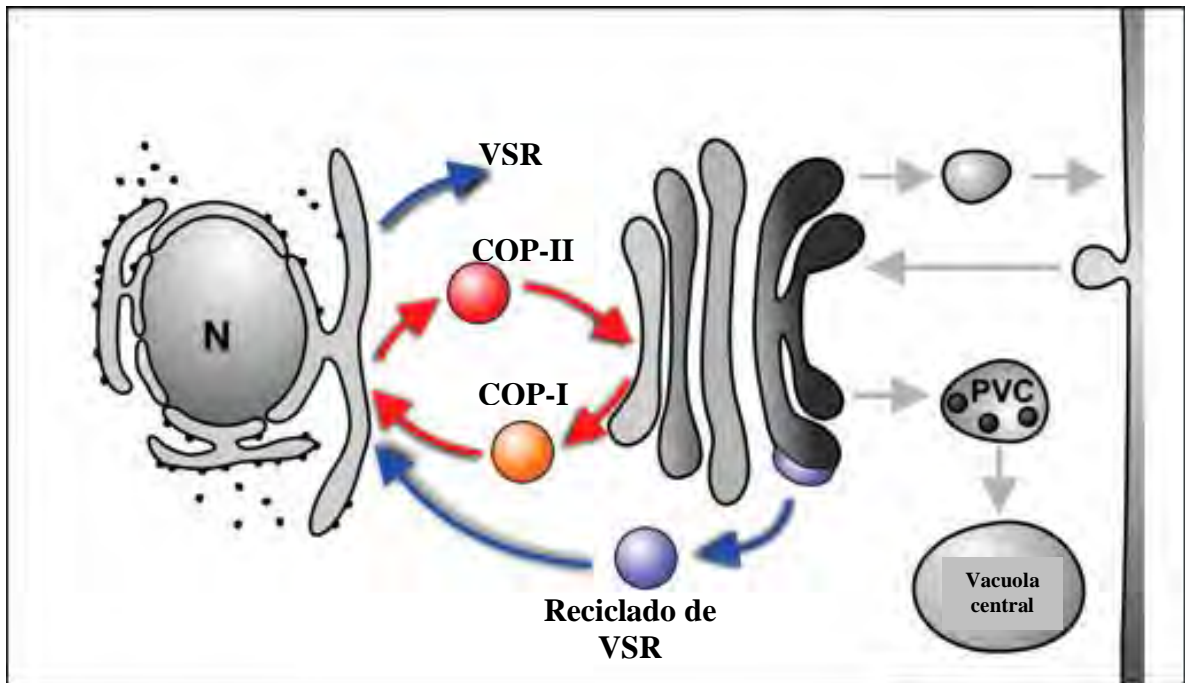
por Otegui y col. 2006 en semillas de arabis en desarrollo, indica que una fracción de los VSRs que no reciclaban es direccionada a vesículas internas de MVB para su degradación en el lumen del PSV.

Todavía no se conoce como se logra el transporte diferencial mediado por VSRs de proteínas vacuolares y líticas a LV o PSV cuando co-existen separadamente o como vacuola central en la misma célula.



**Figura 8:** Participación de los VSR en el modelo propuesto del tráfico de proteínas de reserva y de proteasas de procesamiento en embriones de arabis durante la formación de PSV. (Adaptado de Otegui y col. 2006).





**Figura 9: El mecanismo de reciclado del receptor de direccionamiento vacuolar VSR (BP-80) desde el trans-golgi a vacuolas central en plantas** (Niemes y col. 2010a).

El camino secretorio comienza en el RE. Las proteínas vacuolares son reconocidas por el VSR en el lumen del RE y el complejo ligando-receptor sale del ER (flecha azul) y alcanza el TGN en donde son disociados del receptor VSR. El receptor BP-80 recicla de nuevo al ER por un transporte dependiente de retrómero (flecha azul). Ambas rutas de transporte del receptor BP-80 son independiente del transporte mediado por COPI/II (flechas rojas). Las proteínas cargo vacuolares continúan hacia la vacuola de una manera independiente del receptor. Abreviaciones: N, núcleo; PM, membrana plasmática; PVC, compartimiento pre-vacuolar.

### 3.5.2 La familia de receptores de direccionamiento vacuolar RMR

El estudio de la regiones luminales de los receptores VSR permitió identificar una nueva familia de receptores putativos que fue denominada ReMembr-H2 (receptor de membrana Ring-H2) o familia RMR (Cao et al 2000, Jiang et al 2000). El análisis del genoma de *Arabidopsis thaliana* muestra que posee cinco genes de la familia AtRMRs (AtRMR1-5), mientras que el genoma de arroz (*Oryza sativa*) posee dos genes RMR (OsRMR1-2) (Wang y col. 2011).

Las proteínas RMR se componen de un dominio luminar (LU) en el amino-terminal que consiste esencialmente en un único dominio de PA, pero carece de las repeticiones EGF presentes en VSR, un

dominio transmembrana (TM) cuya estructura secundaria corresponde a proteínas integrales de membrana de tipo I, y una cola citosólica (CT) en el carboxilo terminal con un dominio RING-H2 y una región rica en serinas (Jiang y col. 2000) (Figura 7).

Los primeros ensayos que apoyaron el rol de los receptores AtRMRs en el transporte de proteínas de reserva a vacuolas fueron mediante sobre-expresión de mutantes dominantes negativos del receptor AtRMR1 y la proteína de reserva faseolina (globulina 7S de poroto, *Phaseolus vulgaris*), observándose que la proteína faseolina se acumulaba en el aparato de Golgi y no en la vacuola central de protoplastos de arabidopsis (Park y col. 2005). Luego, se determinó la habilidad del dominio luminal de las proteínas RMRs de unirse con los péptidos ctVSSs de las proteínas de reserva de lectina de cebada y de quitinasa de tabaco de una manera pH independiente (Park y col. 2007). Sin embargo, no se observó unión específica del RMR con ssVSS de proteínas de vacuolas líticas (Park y col. 2007, Dombrowski y col. 1993). En resumen, se postula que los ligandos de RMRs serían las proteínas que contienen señales ctVSSs de la vía a PSV, mientras que los receptores AtVSRs interactuaría con proteínas con señales ssVSS y ctVSS, de la vía a vacuolas líticas y de reserva, respectivamente.

En ensayos de expresión transitoria en protoplastos de mesófilo de hoja de arabidopsis, empleando una versión completa de AtRMR1 fusionada en el carboxilo terminal a proteínas fluorescentes (AtRMR1-FP), se detectó fluorescencia en la vacuola central (Park y col. 2007). Los estudios realizados por inmunoblot de las vacuolas aisladas mostraron que había ocurrido un clivaje de la proteína AtRMR1-FP liberándose la FP en la vacuola por lo que no se puede asegurar que AtRMR1-FP alcanza la vacuola como mencionan los autores. Otros ensayos, que se proponen determinar la funcionalidad de los distintos dominios del receptor AtRMR, consistieron en la expresión de versiones mutadas del mismo, y se mostró que los dominios transmembrana (TM) y citosólicos (CT) expresados sin el dominio luminal (LU), tenían un patrón de localización que coincidía con el marcador de Golgi ST-GFP (sialil transferasa-GFP), sugiriendo que la expresión de estos dominios TM y CT de AtRMR1 por si solos se ubican en el complejo del trans-Golgi (Park y col. 2005). Sin embargo, la expresión transitoria en células de cultivo de tabaco de una construcción conteniendo la proaleurina fusionada a los dominios TM y CT de AtRMR2, se localiza en el tonoplasto de compartimientos tipo PSV por una vía Golgi dependiente (Jiang y col. 2000). Teniendo en cuenta las diferencias entre los trabajos de Park y col. 2005 con los de Jiang y col. 2000, la localización subcelular de los dominios TM y CT de AtRMR aún es controvertida.

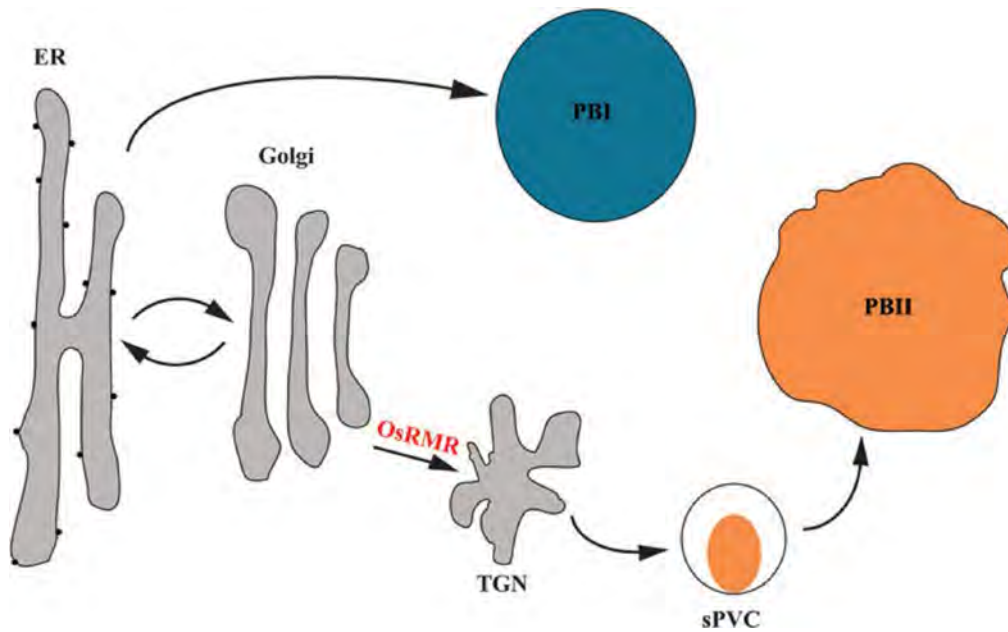
En semillas, los RMRs fueron localizados en el cristaloides de PSV de tabaco y tomate (Jiang y col. 2000) y en PSV de arabidopsis (Hinz y col. 2007). En semillas en desarrollo de arabidopsis, se demostró que los RMR muestran un patrón de localización similar al de la proteína de reserva crucifera, localizándose en el Golgi cis y medio y en vesículas densas (DV) (Hinz y col. 2007). Cabe mencionar que los receptores VSRs también fueron localizados en DV en semillas en desarrollo de arabidopsis (Otegui y col. 2006). En semillas

en desarrollo de tabaco y tomate, RMR se encontró en el PVC de reserva o organela DIP (Jiang y col. 2000). Por el contrario, en semillas en desarrollo de arroz la proteína OsRMR1 se localizó en el aparato de Golgi, específicamente, en el *trans*-Golgi, en un nuevo tipo de compartimientos pre-vacuolares de reserva (PVC) y en los cuerpos proteicos tipo II (PBII) (equivalente de monocotiledónea a PSV). Este nuevo PVC, también fue hallado, en células de tabaco BY2 y células en suspensión de arabisopsis, y es morfológicamente distinto al PVC/MVB positivo para VSRs (considerado más específico de la vía lítica) y por lo tanto, representa el PVC de almacenamiento y se lo denomina sPVC (Figura 10) (Shen y col. 2010).

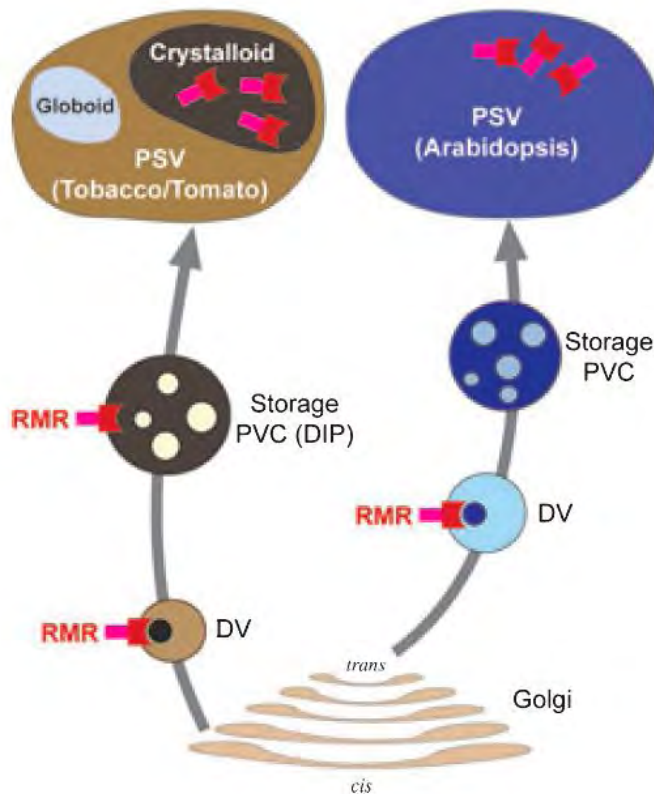
Los datos antes mencionados apoyan la hipótesis que las proteínas RMRs participan en el direccionamiento de las proteínas de reserva y en principio con el análisis en conjunto de todos los datos descriptos, se deduce un mecanismo de transporte en donde agregados proteicos del Golgi emergen en DV hacia el compartimiento PVC y terminan en PSV (Figura 11). Estos resultados son diferentes de los obtenidos para los receptores AtVSRs que se localizan en el *trans*-golgi y en CCV (Neuhaus y Rogers 1998, Jurgens 2004, Masclaux y col. 2005, Robinson y col. 2005).

También, ensayos con AtRMR2 demostraron que esta proteína se localiza en el interior de compartimientos pre-vacuolares, evidenciando un proceso de internalización en el tráfico a PSV (Park y col. 2007). El concepto de que las proteínas RMRs se internalizan elimina la posibilidad de que reciclen para participar en más de una ronda de transporte. Esto abre el interrogante de cómo las proteínas RMRs pueden ser eficientes en el transporte a vacuolas ya que no se podrían reutilizar al no reciclar. Se ha postulado que la agregación de proteínas de reserva dentro de las DV y la participación de las proteínas RMR en la formación de DV son las que hacen eficiente el direccionamiento a PSV (Wang y col. 2011).

Sin embargo, más allá de las controversias por el tránsito de los RMRs, cuando se anula la expresión de distintos miembros de la familia RMRs en arabisopsis, no se observa una alteración en el transporte de la mayor parte de las proteínas de reserva en semillas y tejidos vegetativos (Zouhar y col. 2010). Por ende, si los RMRs poseen alguna función en el transporte de las proteínas de reserva (albúmina 2S y globulina 11S) requiere de más estudios a fin de determinar su modo de acción en el direccionamiento vacuolar, y definir si actúan como un receptor *per se*, o participan en un mecanismo de rescate alternativo o bien colaboran de alguna manera con los VSRs.



**Figura 10: Modelo de tránsito de proteínas de reserva en semillas de arroz.** (Shen y col. 2010). Las prolaminas son sintetizadas en el ER y se insolubilizan formando los cuerpos proteicos PB-I. Otras proteínas de reserva (glutelinas y globulinas), son reconocidas por OsRMR1 en el aparato de Golgi o en el *trans*-golgi y empaquetadas por organelas positivas para OsRMR1 ó sea sPVC, para su posterior liberación en PBII (equivalente a PSV). Referencia: ER, retículo endoplasmático; TGN, complejo del *trans*-Golgi; PB I, cuerpo proteicos tipo I; PB II, cuerpo proteicos tipo II; sPVC, compartimientos prevacuolares de reserva.

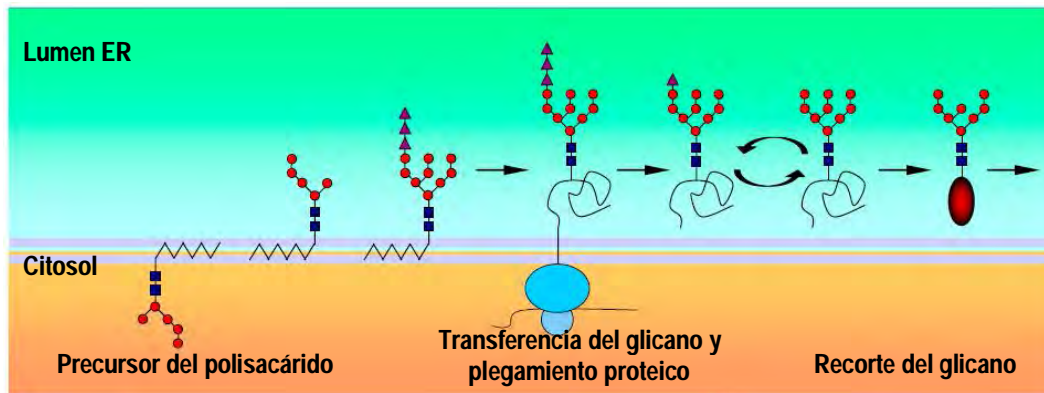


**Figura 11: Localización subcelular, tráfico y posible función de RMRs en semillas en desarrollo.**

En semillas en desarrollo de tabaco y tomate, RMR se encontró en el cristaloid de PSV, en el PVC de reserva o organela DIP; mientras que en semillas en desarrollo de Arabidopsis RMRs se localizaron en DVs. (Jiang y col. 2000, Hinz y col. 2007, Wang y col. 2011).

### 3.6 La N-glicosilación diferencial entre células vegetales y mamíferas

La N-glicosilación de proteínas se inicia en el ER de forma de co-traduccional con la transferencia de un polisacárido precursor (Glc3Man9GlcNAc2), derivado de un lípido dolicol anclado a la membrana del RE, al polipéptido nascente. El precursor es adicionado al residuo de asparagina del péptido específico Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico (Helenius y Aebi 2001, Pattison y Amtmann 2009, Lis y Sharon 1993). La transferencia está catalizada por la oligosacaril-transferasa y, el proceso continúa con una cascada de modificaciones en el lumen del ER. Posteriormente, los residuos de glucosa y manosas son clivados del N-glicano, por glucosidasas y manosidasas ubicadas en el lumen del RE (Lerouge y col. 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 Man9GlcNAc2 y Man8GlcNAc2 (Man9-Man8) (Gomord y col. 2004, Lerouge y col. 1998a) (Figura 12).

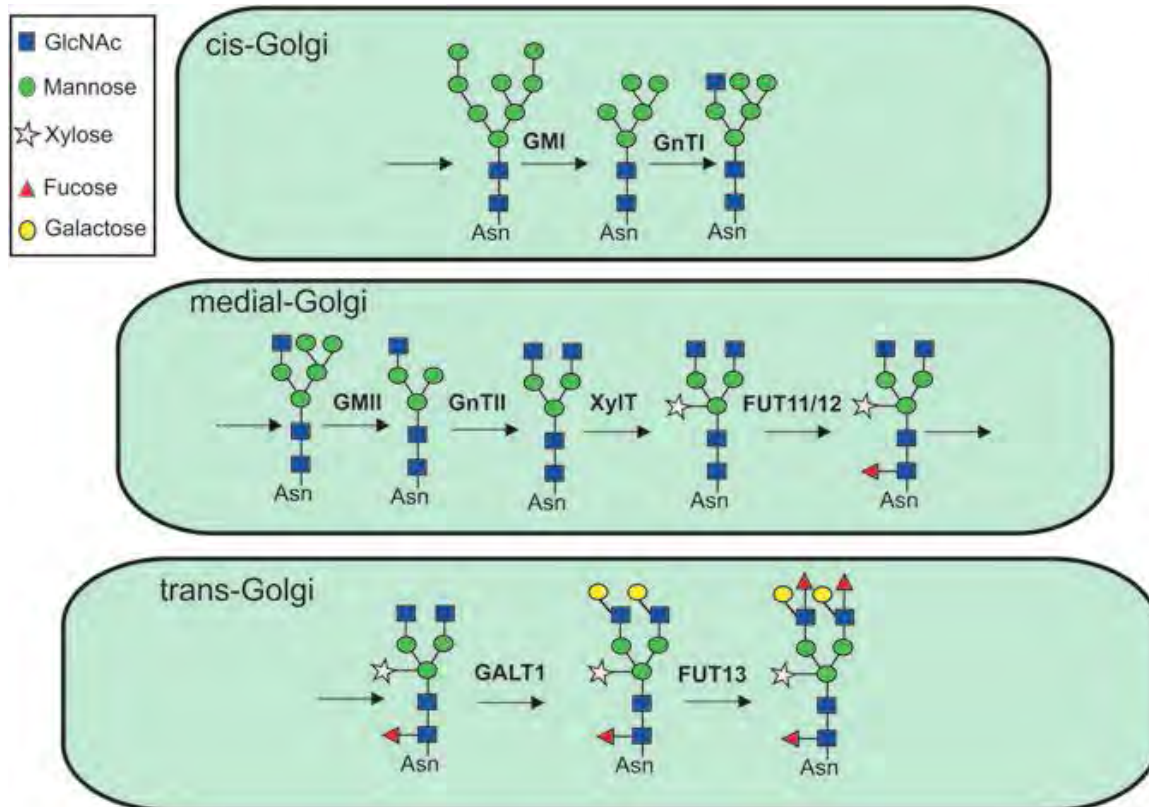


**Figura 12:** Procesamiento de N-glicanos en el RE.

■ N-acetilglucosamina    ● Manosa    ▲ Fucosa

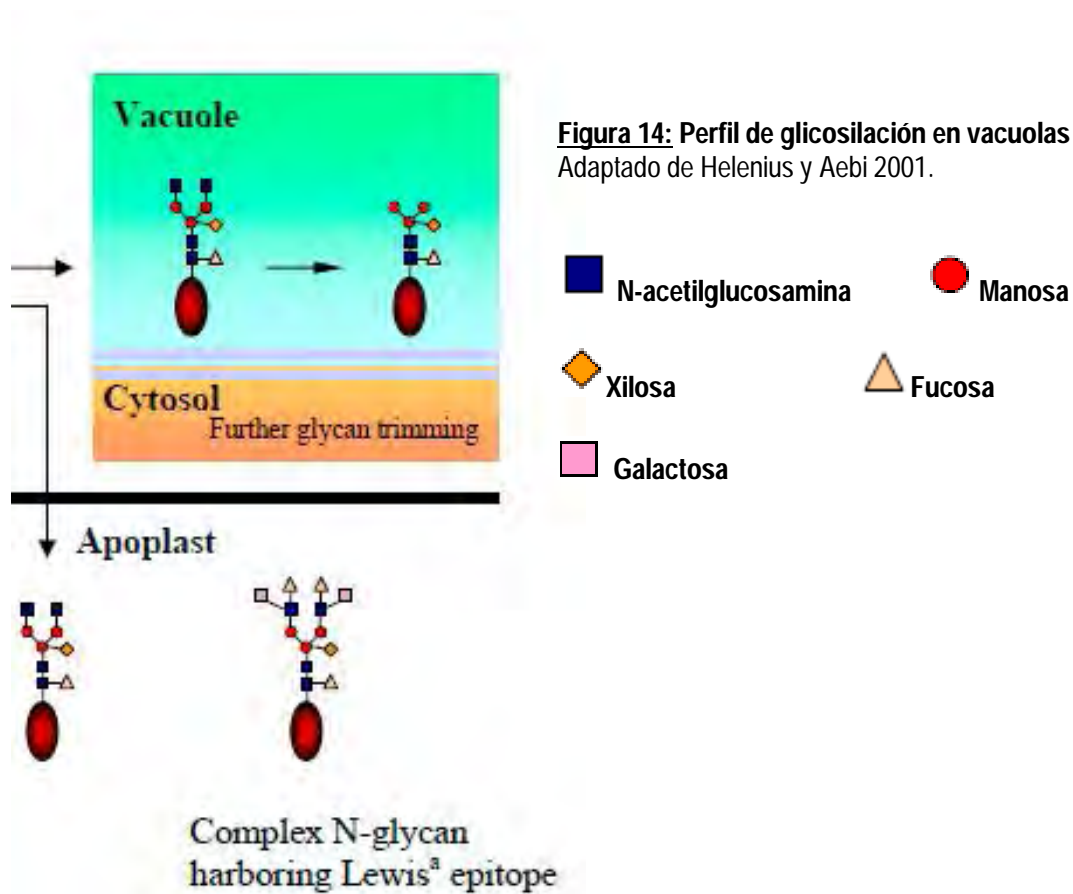
Adaptado de Helenius y Aebi 2001.

Como se ilustra en la Figura 13, las modificaciones posteriores tienen lugar en el complejo de Golgi donde el oligosacárido es reducido a tres manosas terminales, generando el Man5GlcNAc2, por acción de la manosidasa de Golgi I (GMI, Figura 13) (Strasser y col. 1999, Helenius y Aebi 2001, Liebminger y col. 2009). Posteriormente se inicia la incorporación de nuevos residuos glucocídicos por acción de las N-acetilglucosaminil-transferasas I (GNT I), manosidasa de Golgi II (GMII), N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnTII),  $\beta$ 1,2-xilosyl- transferasa (XylT), y  $\alpha$ 1,3-fucosiltransferasa (FUT11/12) (Strasser y col. 2006). La adición de los motivos de Lewis sobre N-glicanos involucra la acción secuencial de la  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa (GALT1) y  $\alpha$ 1,4-fucosiltransferasa (FUT13) (Strasser y col. 2007). Esta reacción se lleva a cabo en el *trans*-Golgi y la presencia de este tipo de glicanos es típico de glicoproteínas extracelulares (Fitchette y col. 1999).



**Figura 13: Procesamiento de N-glicanos en el complejo de Golgi en plantas.** Mientras que la separación espacial de Golgi cis y medio no está bien establecida, las enzimas  $\beta$ -1,3-galactosyltransferasa (GALT1) y  $\alpha$ -1,4-fucosyltransferasa (FUT13) se encuentran ubicadas en el trans-Golgi (Schoberer y Strasser 2011).

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 y Chrispeels 1984) y, la glicofoma vacuolar generalmente queda con la estructura Man3(Xyl)(Fuc)GlcNAc2 (Gomord y col. 2004, Lerouge y col. 1998) (Figura 14). Además, los motivos Lewis no se encuentran en las proteínas vacuolares indicando que es hidrolizado por glicosidasas ubicadas en la vía de transporte a la vacuola o bien dentro de ella (Fitchette y col. 1999).



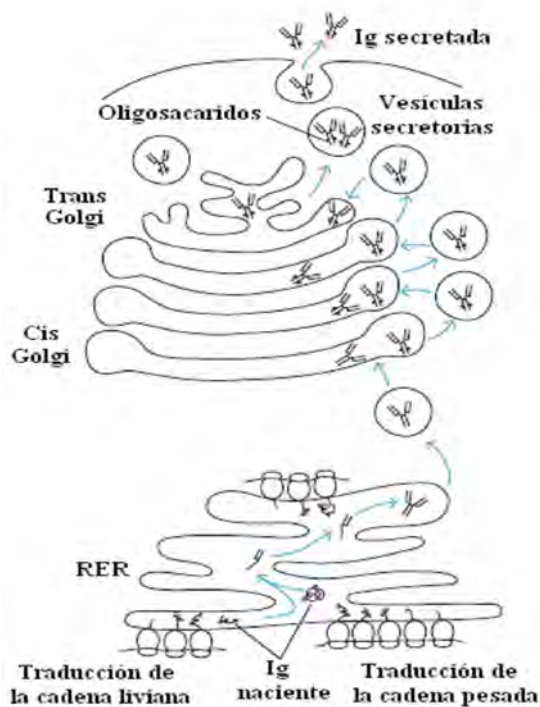
**Figura 14:** Perfil de glicosilación en vacuolas y apoplasto. Adaptado de Helenius y Aebi 2001.

4. Las plataformas de producción de anticuerpos completos en plantas: la situación actual.

4.1 Particularidades del proceso de síntesis, plegamiento y secreción de inmunoglobulinas

Todos los anticuerpos expresados en células eucariotas son dirigidos al sistema de endomembranas o vía secretoria, dado que contiene la maquinaria intracelular precisa para llevar a cabo el plegamiento, ensamblado, y glicosilación proteica de las inmunoglobulinas necesaria e importante para asegurar la funcionalidad biológica (Vitale y Pedrazzini 2005)

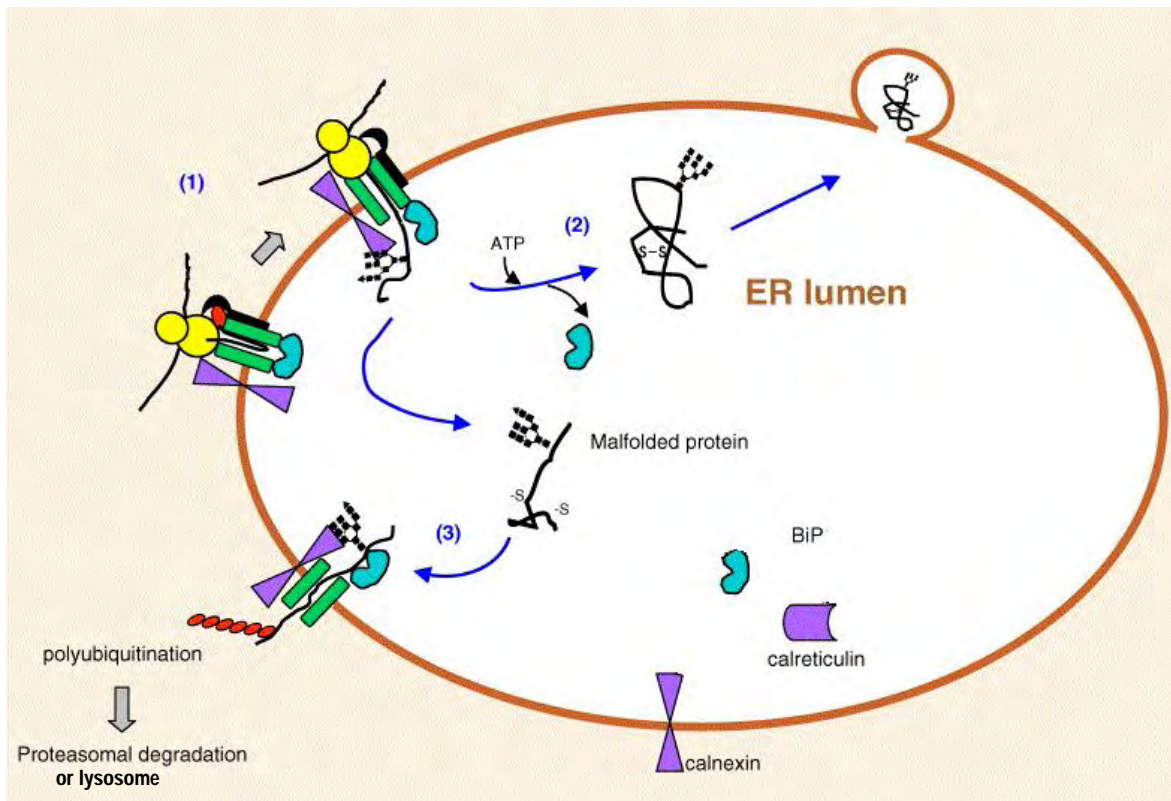
La transcripción de los genes de las cadenas liviana y pesada da lugar a transcritos primarios que contienen intrones. El procesamiento postranscripcional (RNA *splicing*) es requerido para dar lugar al mRNA funcional. Los cuales, una vez protegidos en ambos extremos 5' y 3', son exportados al citoplasma donde serán traducidos a las cadenas polipeptídicas correspondientes, liviana (LC) o pesada (HC). Una vez en el citoplasma de la célula, comienza la traducción de los mRNAs de las LC y HC que tiene lugar en polisomas independientes. Para el ingreso de las cadenas al sistema de endomembranas, se requiere de la presencia de un péptido señal (SP) que provoca la traslocación del péptido naciente hacia el interior del retículo endoplasmático rugoso (RER), posteriormente el péptido señal será eliminado por una peptidasa. En el lumen del RER las cadenas LC y HC interaccionan con chaperonas específicas que permiten que adquieran el plegamiento y ensamblado correcto mientras son glicosiladas. Las inmunoglobulinas completas son transportadas al aparato de Golgi y luego a vesículas secretorias, que se fusionan con la membrana plasmática (Figura 15), para ser finalmente secretadas.



**Figura 15: Esquema simplificado de la síntesis, ensamblado, y secreción de las moléculas de inmunoglobulinas.** Las cadenas livianas y pesadas son sintetizadas en distintos polisomas. En el interior del retículo endoplasmático rugoso tiene lugar el ensamblado de la inmunoglobulina mediante la ayuda de chaperonas. Posteriormente el anticuerpo será movilizado hacia el aparato de Golgi y transportado al medio extracelular a través de vesículas secretorias.



El plegamiento y ensamblado de las de inmunoglobulinas en el ER es un proceso complejo que necesita de diversas chaperonas para generar una inmunoglobulina funcional dada su estructura (Figura 16). La chaperona mejor caracterizada, tanto en células en animales como plantas, es la proteína glucosa-regulada 78 (GRP78) de la familia de HSP70 (*heat shock proteins*), denominada BiP (*immunoglobulin binding protein*) (Boston y col. 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 (Vitale y col. 1995). En el caso de que una proteína recién sintetizada no logre adquirir la estructura tridimensional correcta, permanece unida a BiP y se activa la respuesta UPR (*unfolded protein response*) por la cual, la proteína es exportada fuera del ER para ser degradada lo que revela la importancia de BiP a chaperona en los mecanismos de control de plegamiento en el ER. La chaperona PDI (*protein disulfide isomerase*), residente en ER, es la que cataliza la formación de los puentes disulfuro intra e intercatenarios entre los residuos de cisteína (Freedman 1989), y que son requeridos para el correcto plegado de las inmunoglobulinas.



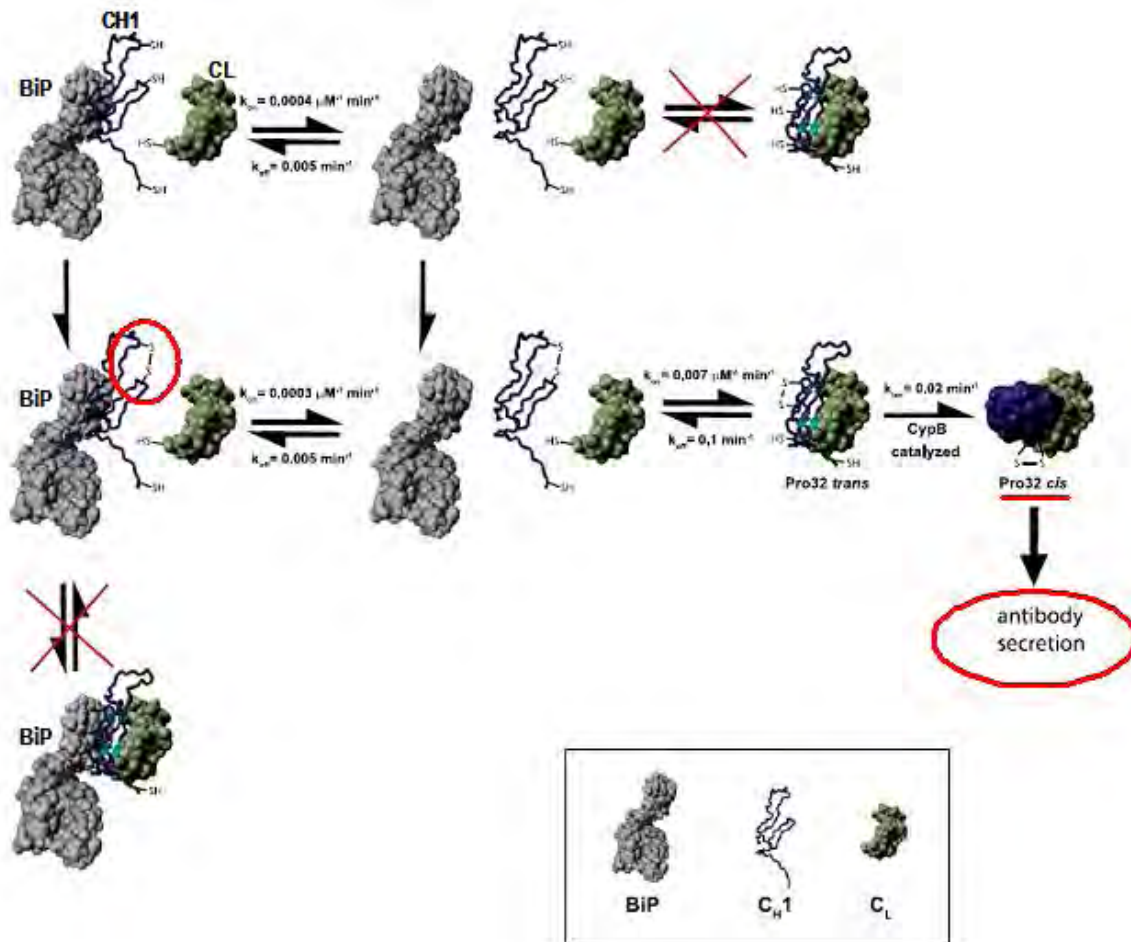
**Figura 16: Representación esquemática de chaperonas residentes en el ER.** (1) translocación co-traduccional facilitada por el complejo chaperonas (calnexina, BiP, entre otras), (2) cooperación en el plegamiento por BiP (3) Las proteínas que no adquieren su plegamiento correcto son exportadas fuera del ER donde son degradadas por el proteosoma. Adaptado de (Ma y Hendershot 2003)

Por otro lado, encontramos las proteínas ligadas a membrana calreticulina y calnexina, que 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, evidenciando el estricto control de calidad que realizan las chaperonas del ER. Mientras que BiP se reconoce regiones hidrofóbicas, calnexina y calreticulina interactúan específicamente con glicoproteínas que poseen glicanos N-ligados, plegados incompletamente. A menos que estén correctamente plegadas, calnexina y calreticulina retienen la glicoproteína reciclándola dentro del lumen del ER. Varios homólogos de estas dos lectinas fueron identificadas en diferentes plantas, como espinaca (Menegazzi y col. 1993), maíz (Kwiatkowski y col. 1995; Napier y col. 1995), *arabidopsis* (Huang y col. 1993; Nelson y col. 1997), y arveja (Hassan y col. 1995).

Para que un anticuerpo pueda ser secretado de la célula y cumplir sus funciones biológicas, los dominios individuales no solo deben plegarse para adquirir su estructura terciaria, sino que también deben ensamblarse en una estructura cuaternaria definida (Porter 1973, Huber y col. 1976). Mientras que las cadenas livianas se secretan del ER cuando se expresan individualmente (Coffino y col. 1970, Melchers 1971), las cadenas pesadas muestran un desorden intrínseco en el CH1 *in vitro* (Feige y col. 2009), y son activa y eficientemente retenidas en el ER por la chaperona BiP (Bole y col. 1986, Hendershot y col. 1987). El CH1 sólo adquiere su plegamiento correcto cuando interacciona con el dominio CL de la cadena liviana. La chaperona BIP en el ER, reconoce el estado de plegamiento incompleto del dominio CH1 y compete por su unión con el dominio CL. Para que el dominio CH1 sea liberado por BiP debe formar su puente disulfuro interno y luego asociarse con CL. Estudios *in vitro* han descrito la cooperación de las chaperonas BiP y PDI en el plegamiento oxidativo de las inmunoglobulinas (Mayer y col. 2000), por ende en la formación de los puente disulfuros internos que involucra a la chaperona PDI. Antes que el plegamiento se complete y sea irreversible la formación del puente disulfuro entre la cadenas LC/CH1, el residuo Prolina 32 en el CH1 debe pasar de *trans* a *cis*, sino queda como un intermediario con un plegamiento parcial. La reacción de isomerización puede ser acelerada por la ciclofilina B que es una peptidil-prolil-isomerasa (Figura 17). Además, se han descritos tres cisteínas en el CH1 que cumplen un rol crucial en el plegamiento, ensamblado y secreción de inmunoglobulinas completas. Si estas tres cisteínas son sustituidas, la cadena pesada puede secretarse independientemente de la cadena liviana (Elkabetz y col. 2005) y no se genera una inmunoglobulina completa.

Por otra parte, el proceso de dimerización de las cadenas pesadas esta limitado por el correcto plegado del homodímero CH3. La formación de la estructura Hoja- $\beta$  en el CH3 es un proceso lento, que requiere de la isomerización de la Pro-35 en su configuración *cis*, una vez que se alcanzó la estructura de hoja- $\beta$  se genera la dimerización de los dominios CH3 y por ende de las cadenas pesadas. Las especies que contengan el isómero incorrecto en el CH3 acumulan intermediarios monoméricos y no diméricos (Thies y col. 1999).

Cabe resalta también, que cada región FR (framework) tiene distintas propiedades estructurales lo que hace que cada anticuerpo, aun en células CHO, tenga problemas de estabilidad y por ende en su expresión.



**Figura 17: Modelo del mecanismo de control de la secreción de IgG.**

Se describen las posibles interacciones del dominio CH1 (azul), en su plegado y ensamblado con CL (verde) y BiP (gris). Abreviaturas: **CH1**: dominio constante-1 de la cadena pesada. **CL**: dominio constante de la cadena liviana. Adoptado de Feige y col. 2009

## 4.2 Los anticuerpos completos expresados en plantas

El primer anticuerpo expresado en plantas fue una inmunoglobulina G1 murina catalítica que fue expresado en tabaco obtenido por fertilización cruzada de plantas expresando los genes *IgH* e *IgL* (Hiatt y col. 1989). Desde esa fecha hasta la actualidad, en plantas se han expresado 51 inmunoglobulinas completas cuyas características de resumen en la Tabla 5. En la misma se presentan los anticuerpos completos expresados en planta ordenados de manera cronológica, pero se incluye de manera secuencial para el mismo anticuerpo, los trabajos con otras estrategias empleadas en años posteriores. Además, se resaltan con colores, el sistema de expresión utilizado, distinguiéndolos entre estable y transiente en dos categorías: utilizando *Agrobacterium* con vectores binarios o basados en vectores virales, y otras dos categorías para distinguir la expresión transiente convencional y aquella que se co-expresa con supresores de silenciamiento génico (HcPro o p19) para cada una de las categorías de transiente. También, se resalta anticuerpos en que se ha evaluado la acumulación en semillas.

Aunque la mayor parte de las inmunoglobulinas expresadas en plantas son gamma de los distintos isotipos (IgG1, IgG2a, IgG4, etc) ya sea de origen humano, murino y quiméricas. También se han expresado inmunoglobulinas M que son pentaméricas (Baum y col. 1996) e inmunoglobulinas A, monoméricas, diméricas y secretorias (Zeitlin y col. 1998, Briggs y col. 2000, Wieland 2004, Wieland y col. 2004). Estas últimas requieren de la expresión simultánea de 4 genes de mamíferos y han mostrado ser efectivas en la prevención de enfermedades de mucosas, para bloquear el ingreso de patógenos contra las que no existen vacunas disponibles, por ejemplo algunos virus y hongos (Zeitlin y col. 1999).

Entre las 51 inmunoglobulinas completas expresadas en plantas, hay veinte anticuerpos dirigidos al tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas (HIV, *Herpes Simple Virus*, *Respiratory Syncytial Virus*, hepatitis B, *West Nile Virus*, *Bacillus anthracis*, Eimeria, virus de Ebola, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, virus de la rabia etc) (Tabla 5). El segundo grupo de anticuerpos expresados en plantas son los siete dirigidos a tratamientos de distintos tipos cánceres entre ellos: trastuzumab, específico de HER2, uno de los anticuerpos *blockbusters* utilizados para el tratamiento de cáncer de mama (Komarova y col. 2011, Whaley y col. 2011), anti-CD20 para tratamientos de Linfoma Non-Hodgkin ([www.biolex.com](http://www.biolex.com)) (Cox y col. 2006), contra el factor de crecimiento epidérmico (Rodríguez y col. 2005), específicos del receptor TNF (tumor necrosis factor) (Komarnytsky y col. 2006), específicos del antígeno del cáncer de colon (Verch y col. 1998), y del antígeno carcinoembrionario humano (Vaquero y col. 1999), entre otros. También ocho anticuerpos específicos de distintas proteínas humanas con distintas aplicaciones: por ejemplo contra la creatina quinasa humana para tratamiento de cardiopatías (De Neve y col. 1993; De Wilde y col. 1996), anti gammaglobulina humana para detectar anticuerpos aglutinantes (Khouidi y col. 1999; Sainsbury y col. 2008; Vezina y col. 2009), específico del antígeno Rhesus D para administrar a madres Rh negativas con bebés Rh positivos

(Bouquin y col. 2002), de la gonadotropina coriónica humana (hCG) para test de embarazos (Kathuria y col. 2002; Sriraman y col. 2004), entre otros. También un anticuerpo específico la toxina microcistina (Drake y col. 2010; Barbi y col. 2011). Estos datos indican que aunque la tendencia es similar a la observada para los anticuerpos terapéuticos producidos en otros sistemas con los anticuerpos para tratar cánceres, en plantas se han expresado menos anticuerpos para desórdenes del sistema inmunológico y mayor número para combatir o prevenir enfermedades infecciosas. Por otro lado una característica propia del sistema es la expresión de inmunoglobulinas A secretorias para bloquear el ingreso de patógenos a través de mucosas y también las empleadas en diagnóstico o como reactivos para la purificación de antígenos.

Tabla 5: Expresión de anticuerpos completos en plantas y estrategias usadas

Anticuerpo	Isotipo	Aplicación/ Indicación	Promotor	Peptido señal/Señal de Targeting	Organismo Huésped	Órgano de acumulación	Nivel de expresión	Referencia
6D4	IgG1 Murino	éster fosfonato catalítico	CaMV 35S	murino/nada	<i>N. tabacum</i>	Hojas Hojas Raíces	1.3%TP 0.01%TP 0.003%TP	Hiatt y col. 1989 Baum y col. 1996
B 1-8	IgMλ Murino	Neuropéptido hapteno	pNos	α-amylase de cebada	<i>N. tabacum</i>	Hojas, callos	no informado	During y col. 1990
MAK33	IgG1k Murino	Enzima humanao - creatina quinasa Tratamiento en enfermedades del corazon	CaMV 35S	2S de reserva Arabidopsis/nada  2S de reserva Arabidopsis/KDEL	<i>N. tabacum</i>  <i>A. thaliana</i> <i>Solanun</i> <i>tubérculososum</i>	callos hojas hojas hojas tubérculos hojas tubérculos	1.3%TSP 0.05%TSP 0.4%TSP 0.1-0.2%TSP 0.1%TSP 0.2-0.75%TSP 0.17- 0.55%TSP	De Neve y col. 1993  De Wilde y col. 1996 De Wilde y col. 2002
CaroRx Ig G1/A	IgG-gamma CH1CH2CH3 quimerico	previene la colonización por estreptococo	CaMV 35S	murino	<i>N. tabacum</i>	hojas	1.5ug/ml ET	Ma y col. 1994
21C5	IgG1k murino	especifico de β1.3- glucuroniltransferasa	CaMV 35S		<i>N. tabacum</i>	raíces	1.1%TSP	Van Engelen y col. 1994
mAb24	IgG2bk murino	Tobacco Mosaic virus (reducing infectivity)	CaMV 35S		<i>N. tabacum</i>	hojas Suspension celular raíces	0.3%TP 0.3%TSP 0.003%TP	Voss y col. 1995 Fisher y col. 1999

Referencias. K: cadena liviana kappa, λ: cadena liviana lambda, quimérico: mezcla de cadenas pesadas gamma/alfa, LC: cadena liviana, HC: cadena pesada. Cuando un único promotor es mencionado, significa que ambas cadenas pesadas y livianas son transcritas por el mismo promotor, CaMV 35S: virus de mosaico de coliflor 35S, CaMV 35S+, virus de mosaico de coliflor 35S con doble enhancer (Kay y col. 1987). Nos: gen de la nopalina sintasa de Agrobacterium tumefaciens, TMV: virus de mosaico de tabaco, CPMV: virus del mosaico del caupi, CPMV delRNA- 2: depleción de la región que codifica la proteína de movimiento y ambas proteínas de cubierta en el RNA-2 (Canizares y col. 2006), CPMVdelHTRNA-2: carece de región HT (hypertranslatable), Pin2: gen del inhibidor de la proteinasa II de papa (Korth y Dixon 1997), promotor (OCS)3Mas: promotor del gen manopina sintasa de Agrobacterium tumefaciens reforzada por un trimero de activación upstream del gen de la octopina sintasa (también de Agrobacterium tumefaciens) (Gelvin et al. 1999), 7S: promotor de la subunidad α' de la proteína de reserva β-conglucina (7S) de soja (Fujiwara y col. 1992), PVX: virus de papa X, gt-1: promotor de la glutelina-1 de el arroz, En2pPMA4: promotor del gen de la ATPase4 de Nicotiana plumbaginifolia reforzada con dos copias del enhancer de CaMV 35S (Zhao y col. 1999). Cuando un único peptido señal es mencionado, significa que ambas cadenas pesadas y livianas están fusionadas al mismo peptido señal, TM: secuencia transmembrana, ELP: péptidos tipo elastina, TP: proteína total, TSP: proteína total soluble, DW: peso húmedo, FW: peso seco. Vectores virales: (1)TMV, (Verch y col. 1998), (2) no competitivos TMV y PVX- tecnología MagniCON (Giritch 2006), (3)CPMV con vectores RNA-1 y RNA-2/delRNA-2 (Sainsbury y col. 2008), (4)CPMV sin RNA-1 y delHTRNA-2- tecnología pEAQ (Sainsbury y Lomosoft 2008), (5)magniCON, sistema viral mínimo del vector PVX con Promotor del bacteriófago T7-tecnología Geneware (Pogue y col. 2010),(6) vector simple con replicones del BeYDVtecnología Gemini (Huang y col. 2010).

estable
transiente-agrobacterium-vectores binarios
transiente-agrobacterium-vectores virales*
transiente-agrobacterium-vectores binarios + supresores silenciamiento
transiente-agrobacterium-vectores virales* + supresor de silenciamiento
semilla

Tabla 5: Expresión de anticuerpos completos en plantas y estrategias usadas (continúa)

Anticuerpo	Isotipo	Aplicación/ Indicación	Promotor	Peptido señal/Señal de Targeting	Organismo Huésped	Órgano de acumulación	Nivel de expresión	Referencia
C5-1	IgG1kappa murino	IgG anti-humanoo reactivo utilizado para la detección de anticuerpos no aglutinantes	CaMV 35S	murino	Medicago sativa	Hojas	0.1-1%TSP	Khoudi y col. 1999 Sainsbury y col. 2008
			CaMV 35S/CPMV(2)	murino	N. benthamiana HcPro (RNA-2)	Hojas	0.4%TSP	
			CaMV 35S/CPMV(2)	murino	N. benthamiana HcPro (delRNA-2)	Hojas	0.75%TSP	Vezina y col. 2009
			CaMV 35S/CPMV(2)	murino/SEKDE L	N. benthamiana HcPro (delRNA-2)	Hojas	1.9%TSP	
			<b>Plastocyanin</b>	murino	N benthamiana	Hojas	106ug/gFW (2.2%TSP)	
				murino/KDEL			211ug/gFW (4.5%TSP)	
	murino murino/KDEL	N. benthamiana (HcPro)		558 ug/gFW (11.7%TSP)				
				757ug/gFW (15,9%TSP)				
Anti HSV-2	IgG1-kappa humanizado IgGA DigA IgA Secretoria	anti-virus del herpes simple 2(HSV-2)	CaMV 35S	SP extensina tabaco	Glycine max (L)	planta entera	no informado	Zeitlin y col. 1998
					Oryza sativa			Briggs y col. 2000
CO17-1A	IgG2A Murino	contra-antígeno de cáncer de colon	TMV promoter(1)	Murino/his6/K DEL	N. benthamiana	hojas	no informado	Verch y col. 1998
			CaMV 35S/Pin 2		N tabacum	hojas	0.02%TSP	Ko y col. 2005
T84.66	IgG1 quimerico	contra-Antígeno carcinoembrionario humano (cáncer)	CaMV 35S		N tabacum	hojas	0.02%TSP	Vaquero y col. 1999
rAb29	IgG1k murino	TMV-coat protein	CaMV 35S	murino	N tabacum	hojas	0.14%TSP	Schillberg y col. 1999

Tabla 5: Expresión de anticuerpos completos en plantas y estrategias usadas (continúa)

Anticuerpo	Isotipo	Aplicación/ Indicación	Promotor	Peptido señal/Señal de Targeting	Organismo Huésped	Órgano de acumulación	Nivel de expresión	Referencia
MGR48	IgG1k Murino	contra- quiste de papa nematode Globodera	CaMV 35S/RNA 1 2	murino	<i>N tabacum</i>	hojas	0.7%TSP	Stevens y col. 2000
Guy's 13	IgG1-kappa murino	previene la colonización por estreptococo	CaMV 35S	murino	<i>N tabacum</i>	cultivo de raices peludas Suspensión celular hojas	2.4%TSP 6.5%TSP 1.27%TSP	Sharp y Doran 2001  Nuttall y col. 2002
GAN4B.5	IgG1 Humano	contra el antígeno-Rh+, responsable de la aloinmunización de madres Rh- portadoras de un feto Rh+	CaMV 35S CaMV 35S RNA 1 2		<i>Arabidopsis thaliana</i>	planta entera	0.6%TSP 0.3%TSP 0.12%TSP	Bouquin y col. 2002
cPIPP	IgG1k quimerico	gonadotropina coriónica humana(hCG)	CaMV 35S	murino(optimizado)/KDEL murino(optimizado)/nada	<i>N tabacum</i>	hojas	0.4-0.8%TSP 0.02-0.1%ET	Kathuria y col. 2002ab  Sriraman y col. 2004
CB-Hep.1	IgG2bk murino	antígeno de superficie Hepatitis B (HBsAg)	CaMV 35S	esporamina papa/KDEL	<i>N tabacum</i>	hojas	0.5%TSP	Ramirez y col. 2003
SO57	IgG1-kappa humano	contra virus rabia	CaMV 35S/Pin2	humano/KDEL	<i>N tabacum</i>	hojas Suspension celular	0.07%TSP 0.4%TSP	Ko y col. 2003 Girard y col. 2006
Avicidin (NeoRx)	IgG	epithelial cellular-adhesion moleculle (EpCAM)			<i>Zea mays</i> <i>En fase clinica II</i>			Ma y col. 2003
CL4	IgG1-kappa humano	hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg)	CaMV 35S  Nitrato reductasa	humanoo or calreticulina hordotionina cebada Native/DDEL retencion RE	<i>N tabacum</i>  <i>Diatom P. tricornutum(alga)</i>	Suspension celular	0.2%TSP 0.25%TSP 8.7%TSP	Yano y col. 2004  Hempel y col. 2011



Tabla 5: Expresión de anticuerpos completos en plantas y estrategias usadas (continúa)

Anticuerpo	Isotipo	Aplicación/ Indicación	Promotor	Peptido señal/Señal de Targeting	Organismo Huésped	Órgano de acumulación	Nivel de expresión	Referencia
N8/N10	IgA, H+L (IgA), H+L+J (dimeric IgA), H+L+J+S (seclgA)	anti-Eimeria	CaMV 35S	Murine SP	<i>N. benthamiana</i>	hojas	~0,030%TSP	Wieland y col. 2004
					<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)	fruta	no informado	Orzaez y col. 2006
IQ6E4	IgG1 kappa humano	antígeno protector (PA) del Bacillus anthracis	CaMV 35S	Humano	<i>N benthamiana</i>	hojas	no informado	Hull y col. 2005
hOAT	IgG1-kappa humanizado	contra factor de tejido	(OCS)3 Mas inducible con 2,4-D	Tomato SBT1/nada	<i>Latuca sativa</i>	hojas	18.1ug/gFW	Negrout y col. 2005
TheraCIM	IgG1-kappa humanizado	receptor del factor de crecimiento epidérmico	CaMV 35S	esporamina de papa/KDEL	<i>N tabacum</i>	hojas	0.03%TSP	Rodriguez y col. 2005
14D9	IgG1 kappa murino	catalítico: protonación enantioselectiva de proquirales éteres enólicos	CaMV 35S+	murino murino/KDEL	<i>N tabacum</i>	hojas	2.9%TSP	Petruccelli y col. 2006
				Beta conglycinin storage protein		semillas	5.2%TSP	
				murino murino/KDEL		semillas	0.41%TSP	
						semillas	0.05%TSP	
						semillas	1.08%TSP	
BR55-2	IgG2a kappa Murino	antígeno asociado al tumor de Lewis oligosacárido Y	CaMV 35S	Murino/KDEL	<i>N. tabacum</i>	hojas	31 ug/g FW	Brodzik y col. 2006

Tabla 5: Expresión de anticuerpos completos en plantas y estrategias usadas (continúa)

Anticuerpo	Isotipo	Aplicación/ Indicación	Promotor	Peptido señal/Señal de Targeting	Organismo Huésped	Órgano de acumulación	Nivel de expresión	Referencia
A5	IgG1 delta humano	especifico tumor humano	CaMV 35S	humano	<i>N benthamiana</i>	hojas	10–15ug/gFW (0.2%TSP)	Giritch y col. 2006
			TMV-HC + PVX-LC(3) TMV-LC + PVX-HC(3)					
3A21	IgG murino	-	CaMV 35S	murino SP murino SP/ esporamin VSS	<i>Nicotiana tabacum</i> (BY2)	Suspensión celular	Man3FucXylGI cNAc2 24.3% 58.5%	Fujiyama y col. 2006  Misaki y col. 2011
S20	IgG1kappa quimerico	anti-Pseudomonas aeruginosa serotype O6ad	CaMV35S	quitinasa <i>A.thaliana</i>	<i>N. tabacum</i>	hojas	0.09%TSP	McLean y col. 2007
MHC class II	IgG2a Murino	contra-complejo de histocompatibilidad de clase II de ratón	CaMV 35S	Murino	<i>N. tabacum</i>	hojas	no informado	Hong y col. 2007
2F5	IgG1 humano	contra-HIV-1	CaMV35S	humano/SEKDEL humano/c- myc,KDEL humano/c- myc,ELP,KDEL	<i>N. tabacum</i>	Suspensión celular hojas	6.4ug/gFW 0.1%TSP 0.6%TSP	Sack y col. 2007 Floss y col. 2008
2G12	IgG1 humano	contra-HIV-1	gt-1	---	Maiz	semillas	75ug/DW	Ramessar y col.. 2008 Schahs y col.. 2007 Rademacher y col.. 2008 Sainsbury y Lomonosoff 2008
			CaMV 35S	---	A thaliana	hojas	0,2%TSP	
			gt-1	SEKDEL	Maiz	semillas	40-60ug/FW	
			CaMV 35S (delRNA-2 sin RNA-1)	---	<i>N. benthamiana</i> P19 <i>N. benthamiana</i> P19 P19	Hojas Hojas	47ug/gFW (1%TSP) 7%TSP	

Tabla 5: Expresión de anticuerpos completos en plantas y estrategias usadas (continúa)

Anticuerpo	Isotipo	Aplicación/ Indicación	Promotor	Peptido señal/Señal de Targeting	Organismo Huésped	Órgano de acumulación	Nivel de expresión	Referencia
anti-tgFB	IgG1 y IgG4	especificas del factor de crecimiento transformante-beta	CaMV 35S	nativo sec KDEL quitinasa A	zanahoria	suspensión celular	1-10%TSP no detectado no detectado no detectado	Shaaltiel y col. 2009
4E10		contra-HIV-1	CaMV 35S	humano	<i>N. tabacum</i>	rizosecreción		Drake y col. 2009
83K7C	IgG1 delta <u>aglicosilada</u>	contra antígeno 83- proteccion anthrax (PA83)		Cloroplasto	<i>Chlamydomonas reinhardtii (alga)</i>			Tran y col. 2009
H10	IgG1 kappa humano	contra-antígeno asociado al tumor tenascina-C (CNC)	CaMV35S	Murino	<i>N. tabacum</i> <i>N. benthamiana (p19)</i>	hojas	0,6-1,1ug/gFW 40 ug/g FW	Villani y col. 2009 Lombardi y col. 2010
LO-BM2	IgG1 kappa quimerico	anticuerpo terapeutico	En2pPMA4	nativo/nada	<i>N. tabacum</i>	Suspension celular hojas	0.22%TSP 0.29%TSP	De Muyneck y col. 2009
3A8	IgG1k murino	microcistina-LR	CaMV 35S	murino murino SP/Membrane retention signal	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	hojas hojas	0.6%TSP 0.005% TSP	Drake y col. 2010 Barbi y col. 2011
hE16	IgG Humanizado (optimización de codones)	contra-proteina de envoltura nuclear West Nile virus	CaMV 35S (3)-TMV y PVX (6)-BeYDV	KDEL geminiviral dual- replicon vectors	<i>N. benthamiana</i> <i>Latuca sativa</i>	hojas	8.1 mg/g FW 270 ug/ gFW (5.7% TSP)	Lai y col. 2010 Lai y col. 2012
CCR5	IgG humanizado	Quimioquinas tratamiento HIV	(5)-PVX-PrT7  (3)-TMV y PVX CaMV 35S		<i>N. benthamiana</i>		250 ug/ gFW 250 ug/ gFW (5%TSP) <30 ug/g FW	Pogue y col. 2010 Valdes y col. 2003

Tabla 5: Expresión de anticuerpos completos en plantas y estrategias usadas (continúa)

Anticuerpo	Isotipo	Aplicación/ Indicación	Promotor	Peptido señal/Señal de Targeting	Organismo Huésped	Órgano de acumulación	Nivel de expresión	Referencia
6D8	IgG1	contra el virus del Ebola	(6)-BeYDV	humano	<i>N. benthamiana</i>	hojas	500 ug/gFW (10%TSP)	Huang y col. 2010
h-13F6	IgG1 humano	immunoproteccion para el virus del Ebola	(3)-TMV y PVX	humano	<i>N. benthamiana</i>	hojas	10%TSP	Castilho y col. 2011
2G8	IgG quimerico	inmunoterapia de infecciones con hongos			<i>N. benthamiana</i>	hoja	50mg /kg	Capodicasa y col. 2011
Trastuzumab	IgG1 humanizado	contra HER2 en cancer de mama	CaMV 35S		<i>N. benthamiana + P19</i>	hojas	100-150ug/gFW (2-3%TSP)	Komarova y col. 2011
			(3)-TMV y PVX		<i>N. benthamiana</i>		300 mg/g FW	
		contra-amiloide (Alzheimer)			<i>N. benthamiana</i>	hojas	no informado	Whaley y col. 2011
		Anti HSV (Herpes Simplex Virus)			<i>N. benthamiana</i>	hojas	no informado	Whaley y col. 2011
Palivizumab	IgG1 humanizado	contra-RSV (infección del virus sincitial)			<i>N. benthamiana</i>	hojas	no informado	Whaley y col. 2011
GD12	IgG1 quimerico	contra epitope inmunodominante de la toxina ricina A	---	murino/	<i>N. benthamiana</i>	hojas	---	Hara y col. 2012
RhinoRx™	IgA secretorias	contra receptor del rinovirus ICAM-1 de celulas epiteliales			<i>Nicotiana tabacum</i>			<a href="http://www.planetbiotechnology.com/products.html#rhinox">http://www.planetbiotechnology.com/products.html#rhinox</a>
DoxoRx™	IgA secretorias	Neutralizar farmaco quimioterapeutico			<i>Nicotiana tabacum</i>			<a href="http://www.planetbiotechnology.com/products.html#doxorx">http://www.planetbiotechnology.com/products.html#doxorx</a>
BLX-301		contra-CD20-tratamiento de linfoma de non-Hodgkin's	LEX System		<i>Lemna minor (planta acuatica)</i>			<a href="http://www.biolex.com/blx301.htm">http://www.biolex.com/blx301.htm</a>

### 4.3 Análisis de las distintas estrategias que han sido empleadas para mejorar los rendimientos de anticuerpos en plantas.

#### 4.3.1 Elementos que controlan la expresión génica

La sobreexpresión de un gen de interés es un desafío ya que hay que superar los distintos mecanismos que controlan de la expresión génica, incrementar la estabilidad de mRNA y proteínas, mejorar la eficiencia del proceso de traducción y plegamiento de la proteína, etc. Para ello se plantean diferentes estrategias que involucran un número importante de elementos como promotores, enhancers, señales de terminación, intrones, secuencias 5' y 3' UTR (*untranslated regions*), optimización de codones, contenido de GC, secuencias que evitan la formación de heterocromatina, que incrementan la estabilidad del mRNA, que mejoran la eficiencia de traducción, etc. Entre estos elementos, la Tabla 5 muestra que uno de los promotores más empleado fue el promotor constitutivo del virus de mosaico de coliflor 35S (35S CaMV, Cauliflower Mosaic Virus), que ha sido utilizado en aproximadamente 70% de los casos, y ha permitido alcanzar niveles de acumulación en transformaciones estables entre el 0.01% y 1% proteína total soluble (TSP) y expresiones transitorias con vectores binarios del 1% TSP (aprox. 50ug/g FW). Por otro lado, el uso del promotor de plastocianina de *Medicago sativa* en vectores binarios en los ensayos de expresión transiente del anticuerpo C5-1 en hojas de *N.benthamina* y *tabacum*, mostró niveles de expresión entre 2 y 5% de proteína total soluble (TSP) (Vezina y col. 2009). El promotor de la ubiquitina de maíz (ubi-1) fue ampliamente utilizado para expresar eficientemente en especies monocotiledóneas (maíz, trigo, arroz, entre otros) (Fischer y col. 2004), y mostró niveles de expresión en hojas y semillas comparables con el 35S CaMV. Por otro lado, encontramos promotores inducibles, utilizados cuando la expresión del transgén interfiere con el desarrollo o crecimiento normal de la planta, como ejemplo se menciona el promotor 3 Mas cuya expresión se activa con el agregado de 2,4-D, con un rendimiento de 18.1ug/gFW en *Latuca sativa* (Negrouk y col. 2005). Otro tipo de promotores utilizados son los promotores específicos de tejido, estos son muy utilizados para concentrar la proteína recombinante en ciertos órganos, como semillas, como el promotor de la glutelina-1 de el arroz (gt-1) que permitió obtener un rendimiento de inmunoglobulinas de 75ug/DW y el promotor del gen de la subunidad  $\alpha'$  de la proteína de reserva  $\beta$ -conglucina (7S) de soja, implementado en nuestro laboratorio con el anticuerpo catalítico 14D9, pero los niveles de expresión obtenidos fueron menores que utilizando el promotor 35S CaMV para las versiones secretorias del anticuerpo y mayores en el caso de mAb fusionado a señales de retención en retículo endoplásmico. También se ha mostrado que el cambio en la señal de terminación de la transcripción afecta los niveles de expresión. Por ejemplo, la secuencia terminadora de un gen codificante para una proteína de shock-térmico de *Arabidopsis thaliana* produce una aumento en la transcripción de un gen foráneo en cuatro veces (Nagaya y col. 2010).

Entre las consideraciones estándares adoptadas para optimizar los niveles de expresión de anticuerpos en ensayos de expresión estable y transiente se destacan, la incorporación de enhancers transcripcionales y traducionales, la remoción de las regiones nativas 5' y 3' UTR (regiones no traducibles) del gen ectópico por secuencias leader 5'-UTR del virus del mosaico de coliflor y 3'-UTR, el gen RUB13 de poliubiquitinación de arroz, entre otros, los cuales han demostrado de manera individual mostrar mejorar los niveles de acumulación de transgenes (Lu y col. 2008, Sharma y col. 2008). 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 consenso Kozak de plantas para favorecer el inicio de la traducción (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002) o el empleo luego del codón de inicio de secuencias GCT TCC TCC, o previamente ACC or ACA (Sharma and Sharma, 2009). También, el eliminar de la secuencia intrones críticos secuencias ricas AT (que provocan el "resbalado" de los ribosomas) o que poseen complementaridad que haga que el RNA adquiera estructuras secundarias. Las variaciones en los niveles de expresión de un transgén además de depender de los elementos regulatorios de la transcripción incorporados, se ve afectada por efectos de posición. Por ello, muchas estrategias han desarrollado vectores con cassettes de expresión que incorporan regiones de unión a la matriz nuclear (MARs, *Matriz Attachment Regions*), las cuales son secuencias regulatorias que evitan la formación de heterocromatina, lo que facilita la transcripción activa del transgén (Streatfield 2007).

#### **4.3.2 Direccionamiento subcelular**

Como se mencionó anteriormente, uno de los factores más importantes que reduce los rendimientos y afecta la calidad de la proteína producida en plantas es la degradación proteolítica. En teoría, la manera más fácil de minimizar la hidrólisis proteolítica en plantas es con el uso de líneas mutantes deficientes en proteasas activas contra la proteína de interés. Líneas celulares deficientes en proteasas de organismos huéspedes simples, como *Escherichia coli*, fueron obtenidas hace años, pero este diseño no es aplicable a organismos multicelulares complejos, como lo son las plantas, dado el papel fundamental que tienen las proteasas en el crecimiento y desarrollo (Schaller y col. 2004), la diversidad estructural y la variabilidad de expresión según el metabolismo y compartimiento (Benchabane y col. 2008). En consecuencia, estrategias comunes para evitar la proteólisis no deseada deben ser llevadas a cabo en plantas, involucrando estrategias de direccionamiento de anticuerpos a compartimientos específicos.

Todos los anticuerpos expresados en plantas son dirigidos al sistema de endomembranas, dado que contiene la maquinaria celular necesaria para la glicosilación proteica y para la formación de puentes disulfuros, como también un sistema de control de la calidad del plegamiento proteico, importante para asegurar la funcionalidad biológica (Vitale y Pedrazzini 2005). Las localizaciones subcelulares de los

anticuerpos expresados en plantas en la vía secretoria descriptos son el ER, la vacuola, cuerpos proteicos, tipo I o II y el apoplasto (Wang y Ma 2012).

Como se mencionó anteriormente, el retículo endoplasmático provee un ambiente oxidante y abundante cantidad de chaperonas para asegurar un plegamiento funcional, y posee un sistema de control que retiene a las proteínas hasta que no adquieren una conformación correcta. Además, las plantas naturalmente acumulan proteínas en el ER que luego derivan en agregados proteicos que se acumulan durante el desarrollo de semillas (ejemplo, los cuerpos proteicos donde se depositan prolaminas). Por ello, en la mayoría de los anticuerpos expresados, en los que se modificó el direccionamiento subcelular, están fusionados a la señal de retención a ER: HDEL, KDEL y SEKDEL. Los niveles de acumulación varían entre 2 a 7 veces comparados con una proteína idéntica que carece de la señal de retención al ER (Petruccelli y col. 2006, Sainsbury y col. 2008, Sainsbury y Lomonossoff 2008). Cabe destacar, que los anticuerpos retenidos en el ER no sufren las modificaciones de los glicanos típicas del complejo de Golgi, lo que evita la adición de fucosa  $\alpha$ 1-3 y xilosa  $\beta$ 1-2 típicos de plantas (Sriraman y col. 2004), pero los glicanos incorporados a la proteína poseen 7 u 8 manosas que no aparecen normalmente en proteínas secretorias, pueden ser inmunogénicos (Petruccelli y col. 2006), y no deseables desde el punto de vista farmacocinético (De Muyck y col. 2010).

Como se puede observar en la Tabla 5, durante los 10 primeros años una gran cantidad de anticuerpos eran expresados sin señal de direccionamiento por lo que eran secretados obteniéndose niveles de acumulación dentro de un rango 0.01 y 0.1% de proteína total soluble (TSP) (Doran y col. 2006). Estos bajos niveles se explican por la elevada actividad proteolítica del espacio apoplástico, y del medio extracelular en el caso de cultivo de células vegetales (Goulet y col. 2011). Sin embargo, no todos los anticuerpos expresados sin señal de direccionamiento son secretados. El anticuerpo quimérico LO-BM2, con un péptido señal nativo murino y sin señal de direccionamiento, sólo es parcialmente secretado localizándose una fracción en el ER cuando se expresa en células de BY2, mientras que en células de epidermis en plantas de *N. tabacum*, se localizó en compartimiento pre-vacuolares (De Muyck y col. 2009). Por ende, los distintos anticuerpos expresados sin señales de direccionamiento que ingresan al sistema de endomembranas no necesariamente van a ser secretados y este efecto puede atribuirse a secuencias direccionamiento encriptadas.

La otra estrategia utilizada para evitar la degradación es el direccionamiento a vacuolas que será tratado en detalle en la sección 5.

#### 4.3.3 Expresión en distintas especies y tejidos vegetales

La mayor parte de los anticuerpos expresados de forma estable han sido producidos en plantas de *N. tabacum*, mientras que *N. benthamiana* es la más utilizada para expresión transitoria (Tabla 5). Otras especies utilizadas son maíz, arroz, soja, tomate, zanahoria, lechuga, alfalfa, papa. Otros sistemas son la expresión en musgos (review, Decker y Reski 2008), algas (review, Franklin y Mayfield 2005) y en lema (Cox y col. 2006). Aunque el tejido más empleado es hoja, también se han expresado en semillas, raíces, tubérculos y frutos, como así también en tejidos no diferenciados como suspensiones celulares y callos (Tabla 5).

Los rendimientos de expresión de anticuerpos en suspensiones celulares son adecuados y en muchos casos con un incremento en 5 veces en comparación con los valores obtenidos en hojas para el mismo anticuerpo, como es el ejemplo del mAb Guy's 13 (Sharp y Doran 2001, Nuttall y col. 2002), el mAb SO57 (Ko y col. 2003, Girard y col. 2006).

En semillas, hay pocos anticuerpos informados, entre ellos se encuentra el anticuerpo 14D9 en su versión secretoria y de retención en el ER expresado en tabaco. El anticuerpo 14D9 secretorio se acumula con niveles de 0.05% TSP en el apoplasto y matriz de PSV, sin embargo en hojas es secretado al apoplasto (Petruccelli y col. 2006). El mAb14D9-KDEL mostró un rendimiento de 1.08%TSP en semillas y si bien la señal de retención en el ER fue eficiente en hojas, en semillas una fracción se localizó en el apoplasto y otra en la matriz del PSV (Petruccelli y col. 2006). En semillas de maíz se expresaron el mAb2G12 secretorio y mAb-2G12-KDEL (contra HIV-1) con rendimientos de 75ug/DW y 40-60ug/FW, respectivamente. El mAb-2G12-KDEL se localizó en cuerpos proteicos donde se acumulan prolaminas (Rademacher y col. 2008). Esta localización, está de acuerdo con el hecho de que estas plantas naturalmente acumulan proteínas en el ER.

Dado el análisis de las diferentes localizaciones en los distintos tejidos, se puede determinar que algunos anticuerpos fueron localizados en el compartimiento subcelular esperado, mientras que otros parecen ser, en parte, acumulados en sitios no esperados (During y col. 1990; Petruccelli y col. 2006; De Muyck y col. 2009). Más aun, el mismo anticuerpo con los mismos elementos de expresión, muestran diferente localización subcelular, dependiendo del tejido en que se expresan (Petruccelli y col. 2006, De Muyck y col. 2009). Sin embargo, es difícil proporcionar una explicación coherente para estos resultados, porque fueron obtenidos con diferentes anticuerpos, péptidos señales, promotores y organismo huésped. Desde un punto de vista práctico, una localización subcelular heterogénea, genera un producto final con heterogeneidad y / o recuperación reducida, lo que representa un problema para la producción industrial de anticuerpos a gran escala que deben ser homogéneos (por ejemplo: terapéuticos, de diagnóstico). Por ello, es necesario entender mejor el direccionamiento subcelular.



#### 4.3.4 Sistema de expresión basado en vectores virales

La expresión transiente mediante *Agrobacterium tumefaciens* basado en vectores virales, han revolucionado el campo de la expresión transitoria en estos últimos años, obteniéndose muy buenos niveles de expresión entre 10 y 100 veces superior a los obtenidos con vectores binarios (Giritch y col. 2006, Pogue y col. 2010, Whaley y col. 2011). Los distintos sistemas de expresión transiente basados en vectores virales se detallan a continuación. MagniCON se basa en el uso de dos vectores virales no competentes entre sí, TMV (virus mosaico de tabaco) y PVX (el virus de papa X), que codifican una cadena del anticuerpo cada uno, y son introducidos en la célula vegetal por infiltración con *A. tumefaciens* (Giritch y col. 2006). Los rendimientos obtenidos con MagniCON corresponden aproximadamente al 10%TSP. Mientras que informes previos con los mismos anticuerpos en ensayos de expresión transiente con vectores binarios fue del 0,2%TSP (Giritch y col. 2006). Otro sistema de expresión descrito fue el que se basa en el virus del mosaico del caupí (CPMV) con *A. tumefaciens*, que consiste en un vector de RNA-1 codificando para la replicasa y dos vectores de RNA-2 modificados con los genes *IgH* e *IgL*, obteniéndose niveles de acumulación de 1,9% TSP (Sainsbury y col. 2008). Sin embargo, este método fue luego mejorado y denominado pEAQ, utilizando un vector denominado delHTRNA-2, que carece de región HT y genes que codifican para las proteínas de cubierta y movimiento, y por ende pierde la capacidad de propagación, sin replicación mediada por RNA-1, en donde la transcripción esta bajo el control de un promotor de planta y la alta expresión la confieren las regiones virales 5' y 3' UTRs; los niveles informados para la expresión de anticuerpos descritos fueron de aprox. de 7% TSP (Sainsbury y Lomonosoff 2008). Se describe también la tecnología Geneware (Pogue y col. 2010) que se basa en un sistema minimizado de MagniCON, en donde se utiliza solo el vector basado en PVX bajo promotor del bacteriófago T7 y ambas cadenas son subclonadas en el mismo vector. Un ejemplo de la tecnología Geneware es la expresión del mab CCR5 en el cual se observó niveles de acumulación de 5%TSP, similares a los obtenidos para el mismo anticuerpo empleando la tecnología MagniCON. Por último, la tecnología Gemini, que consiste en un vector simple con replicones derivados del virus del enanismo amarillo del frijol (BeYDV), mostró ser eficientemente al expresar el mab 6D8 contra el virus del Ebola, con rendimientos de 10%TSP (Huang y col 2010) y el mab hE16 contra el antígeno del virus West Nile en *Latuca sativa* con una acumulación de 0.27 mg/gFW (aprox. 5,7%TSP) (Lai y col. 2012).

#### 4.3.5 Supresores de silenciamiento

Los ensayos de expresión transiente de mAbs con ambos tipos de vectores, binarios y virales, se co-expresaron en conjunto con supresores de silenciamiento de RNA, que mejoran aún más los niveles de acumulación. El supresor p19 incrementa los niveles de acumulación de diversas proteínas recombinantes en 50 veces (Voinnet y col. 2003). Específicamente, en el caso de inmunoglobulinas, la coexpresión con el

supresor p19, produce incremento de la acumulación de la cadena pesada y liviana entre 8 y 3 veces, respectivamente (Circelli y col. 2010). Con el anticuerpo de diagnóstico, C5-1 en combinación con el empleo del promotor de plastocianina, con y sin señal KDEL, en presencia del supresor de virus de papa HcPro se obtuvo un incremento de 5.3 y 3.6 veces, respectivamente (Vezina y col. 2009). El incremento en los niveles de acumulación en presencia de p19 persiste entre 5 a 12 días, mientras que para HcPro disminuyó en este período. Estos datos indican que la expresión transiente empleando *agrobacterium* se encuentra limitada por el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) y que puede resolverse usando proteínas supresoras codificadas por virus (Voinnet y col. 2003).

Los métodos de expresión transiente permitieron la producción de anticuerpos de manera rápida y con rendimientos 10 veces superiores en comparación con los niveles alcanzados por expresión estable.

#### **4.3.6 Degradación de anticuerpos expresados en plantas**

Uno de los inconvenientes más importantes en la producción de anticuerpos en plantas es la pérdida de material debido a la degradación proteolítica, que no es específica de este sistema expresión, porque ocurre en muchos de los casos de expresión heteróloga. La presencia de versiones del anticuerpo de distintos pesos moleculares fue informada en la mayoría de los mAbs sintetizados en células vegetales. La presencia de bandas de distinto tamaño se atribuye tanto a intermediarios de las distintas etapas del ensamblado y a la actividad proteolítica.

En todos los tejidos analizados: hojas, callos, tubérculos, raíces y semillas se ha informado procesos de degradación, quedando claro que la actividad proteolítica extracelular es el principal factor a considerar en la producción de anticuerpos en plantas (van Engelen y col. 1994, Sharp y Dorany col. Komarnytsky y col. 2006, De Muijnck y col. 2009).

La diversidad de especies huésped y anticuerpos analizado, no permiten establecer normas generales de patrones de degradación. En tres casos de anticuerpos IgG1 humanos (2G12, H10 y LO-BM2) el sitio de clivaje más sensible a la actividad proteolítica identificado es en la región cercana a la bizagra (Ramessar y col. 2008, Villani y col. 2009, De Muijnck y col. 2009). La degradación proteolítica en el anticuerpo Guy's 13 murino ocurre en el medio extracelular y también en el paso entre el RE y Golgi. El mAb 14D9-KDEL también sufren degradación cuando se expresa semillas de tabaco (Petruccielli y col. 2006). El medio extracelular de *N.tabacum* (tanto el apoplasto como el medio de cultivo en células de suspensión) contiene varias proteasas capaces de degradar IgG humana *in vitro* (De Muijnck y col. 2009). En cambio, los resultados informados en semillas y tubérculos ponen de manifiesto las ventajas de los compartimientos de reservas que presentan una actividad metabólica reducida (Benchabane y col. 2008).

Por otro lado, estrategias de fusión a elementos estabilizadores fueron llevadas a cabo, como la fusión a pépticos tipo elastina (ELPs) al carboxilo terminal del mab 2F5 mejorando su estabilidad mientras mantiene la capacidad de unión al antígeno comparable con los producidos en células (Floss y col. 2009).

#### **4.4 Glicoingeniería como estrategias para producir anticuerpos completos de mayor actividad específica y farmacocinética mejorada.**

Las plantas son consideradas una alternativa de expresión atractiva para glicoproteínas, como los anticuerpos, porque son económicas, fácilmente escalables y libres de patógenos humanos, y principalmente pueden llevar a cabo N-glicosilaciones. Además, las proteínas glicosiladas en plantas poseen una uniformidad considerable, lo cual es una ventaja frente a sistema de expresión en mamíferos (Steinkellner y col. 2010). Sin embargo, la glicosilación no-mamífera es un de los principales desafíos que presenta el sistema de expresión en plantas para su plena explotación, específicamente para aquellos anticuerpos con utilidad en terapias (Obembe col. 2010).

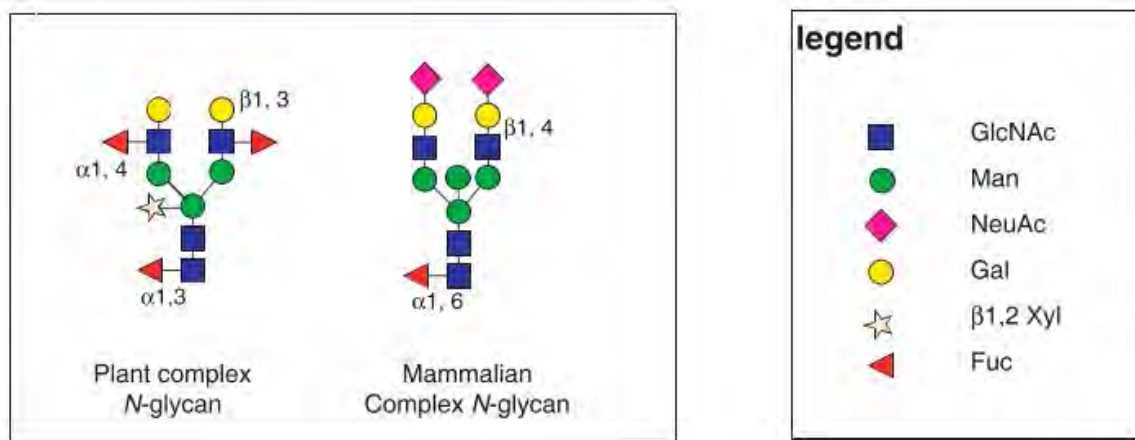
Como se mencionó anteriormente, en el complejo de Golgi se adquieren glicanos complejos, característicos de la célula vegetal, denominados  $\alpha(1,3)$ -fucosa y  $\beta(1,2)$ -xilosa (modificaciones ausentes en mamíferos), con el potencial de alterar la bioactividad de las glicoproteínas producidas en plantas y transformarlas en inmunogénicas y/o alergénicas (Doran 2000, Gomord col., 2010). Además, las plantas no sintetizan naturalmente glicanos específicos de humanos o animales, como la  $\beta$ -1,4-galactosa (producen  $\beta$ -1,3-galactosa) y el ácido siálico (Gomord col. 2005, Gomord col. 2010, Paccalet col. 2007) (Figura 18).

En base a esto, en los últimos años se ha puesto un esfuerzo considerable en modificar la maquinaria de glicosilación en plantas para generar glicoproteínas "más" humanas. Este trabajo focalizó en dos grandes estrategias: por un lado, prevenir la adición de N-glicanos específicos de plantas xilosa beta 1-2 y fucosa alfa 1-3 y por otro lado, incorporar enzimas que generen N-glicosilaciones típicas de mamíferos (Figura 19). Se han desarrollado estrategias de RNAi para silenciar las transferasas fucosil y xilosil en *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis* y *Physcomitrella patens*, *Lemna minor* (Cox y col. 2006) (Figura 19, estructura 1). Por otro lado, la expresión de mutantes de galactosiltransferasas produjo una fuerte inhibición de la adición de xilosa y fucosa en *Nicotiana tabacum* (Bakker y col. 2006) dado que los intermediarios galactósidos no eran sustrato de la xilosil y fucosil transferasa (Figura 19, estructura 5).

En *Nicotiana tabacum* se desarrolló las primeras líneas transgénicas que expresan  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa, es decir que incorporaban glicanos típicos de mamíferos (Palacpac y col. 1999, Bakker y col. 2001). La N-glicosilación  $\beta$ -1,4-galactosa se observó en los anticuerpos producidos por estas plantas transgénicas pero también contenían glicanos con xilosa beta 1-2 y fucosa alfa 1-3 (Figura 19, estructura 2). Posteriormente, la combinación del uso de RNAi para silenciar las transferasas fucosil y xilosil junto con la

expresión combinada de la  $\beta$ -1,4-galactosyltransferasa dieron lugar a anticuerpos sin xilosa beta 1-2 y fucosa alfa 1-3 y con  $\beta$ -1,4-Galactosa (Figura 19, estructura 3). Lo más interesante, fue que la glicosilación de estos anticuerpos fue muy homogénea y presentó una funcionalidad superior en ensayos de neutralización de HIV (Strasser y col. 2009).

Recientemente se ha mostrado que la introducción en plantas de las seis enzimas de mamíferos necesarias para la síntesis de ácido siálico permite otorgar a estas células la capacidad incorporar el ácido N-acetil neurámico correctamente un anticuerpo monoclonal (Figura 19, estructura 4) (Castilho y col. 2010). Esta modificación es importante para incrementar el tiempo de vida media de anticuerpos terapéuticos en sangre.



**Figura 18: Diferencias estructurales entre la N-glicosilación de plantas y mamíferos** (Vézina y col. 2009)

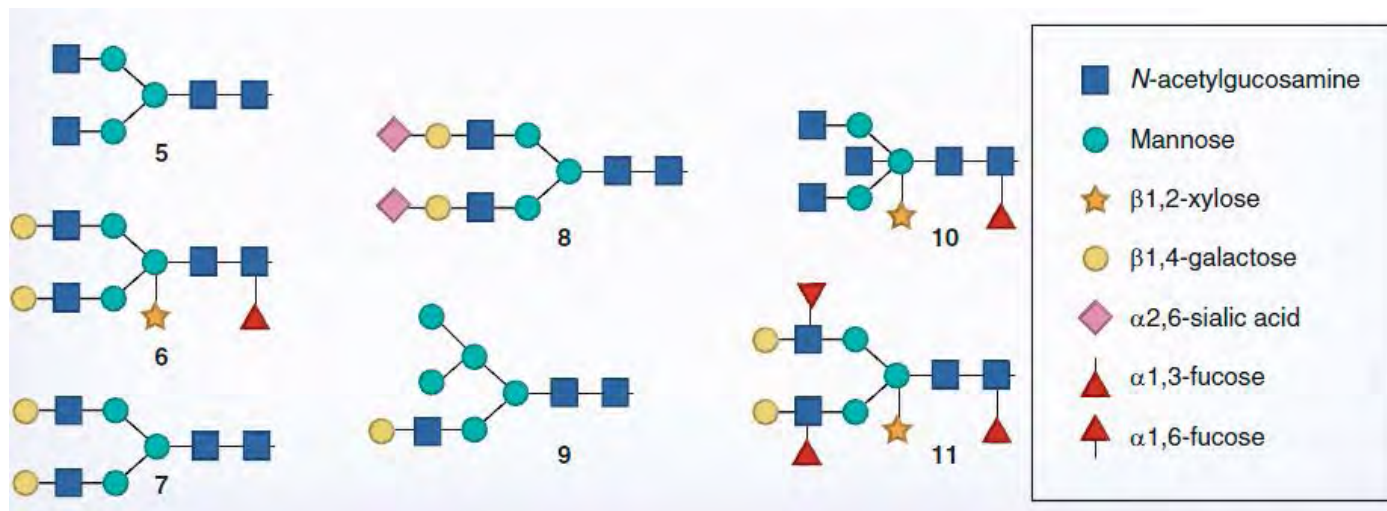
En mamíferos, la estructura de Lewis<sup>a</sup> se conoce como responsable del reconocimiento célula-célula (Feizi 1993) y, de participar en los grupos histológicos sanguíneos (Henry y col. 1995). La expresión en simultaneo de la  $\beta$ 1,4-galactosiltransferasa y  $\alpha$ 1,3-fucosiltransferasa han generado en tabaco estructuras de Lewis<sup>a</sup> (Figura 19, estructura 7) (Rouwental y col. 2009). La expresión de GnTII permitió la generación de glicanos disecionados (Figura 19, estructura 6) (Rouwental y col. 2007) que son difíciles de producir aún en células animales (Raju y col. 2000).

En conclusión, las limitaciones de los sistemas vegetales de glicosilar adecuadamente proteínas terapéuticas han sido resueltas con las estrategias glicoingeniería mencionadas.

#### 4.5 Proteínas terapéuticas producidas en plantas: ingreso a ensayos de evaluación clínica y las perspectivas de aprobación por los organismos regulatorios.

La incorporación en el mercado de proteínas producidas en plantas afianzo la plataforma de *molecular farming* como una tecnología de producción viable, y se debe a los numerosos esfuerzos

publicados que aportan soluciones a las limitaciones técnicas que presenta la plataforma (De Muynck y col. 2010) y el desarrollo de una vía de reglamentación adecuada a las buenas prácticas de fabricación (GMP) (Fischer y col. 2011). Sin embargo, aún no se han aprobado productos farmacéuticos derivados de plantas para uso humano, aunque en este período la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en USA está a punto de aprobar una glucocerebrosidasa recombinante producida en células de zanahorias para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher y en Francia ha sido aprobado para la venta.



**Figura 19: Glicoingeniería desarrollada en plantas para la producción de anticuerpos con N-glicanos típicos de mamíferos.** (Bosch y Schots 2010).

Los productos farmacéuticos ya establecidos en el mercado consisten por un lado, en la subunidad vacunal derivada de tabaco contra la enfermedad de Newcastle (causada por el virus del West Nile) que fue aprobada por la USDA en febrero del 2006 para su uso en aves de corral, y por otro lado, el anticuerpo completo producido por la empresa cubana Heber Biotec empleado para purificar el antígeno de la vacuna contra la hepatitis B Heberbiovac-HB en junio del 2006 (Twyman y col. 2012), siendo el único anticuerpo completo producido en plantas que alcanzó el mercado. En la actualidad se encuentran varios anticuerpos completos en fases clínicas o en vías de entrar al mercado que son:

- CaroRx de tobacco (Planet Biotechnology), indicado para prevenir caries dentales (EMA lo aprobó pero la FDA todavía no)
- BLX-301, un anticuerpo contra-CD20 para el tratamiento de la enfermedad de non-Hodgkin, expresado en la planta acuática *Lemna minor* por Biolex Inc.
- MAPP66, una combinación de anticuerpos con efecto microbicida HSV/HIV (b12, 2G12, 2F5 y 4E10), expresado en *N.benthamiana* usando la tecnología de Bayer MagniCON (magniflection).
- 2G12, un anticuerpo neutralizante de HIV expresado en tabaco (Fraunhofer IME/Pharma-Planta).

A pesar de que hay varios anticuerpos en fase clínicas o por entrar al mercado, se espera que el sistema de expresión en plantas mejore aun más (De Muynck y col. 2010).

## 5. El direccionamiento a vacuolas como estrategia para estabilizar e incrementar la acumulación de proteínas recombinantes.

Como se mencionado previamente, la degradación proteica es uno de los factores principales que causa los bajos niveles de acumulación de proteínas producidas en plantas, (Doran y col. 2006). La adición de señales de direccionamiento a compartimientos específicos en muchos casos incrementa estos niveles (Benchabane y col. 2008). Muchas proteínas secretorias se acumulan en mayores niveles que las expresadas en el citosol (Schillberg y col. 1999). En semillas, la acumulación de proteínas recombinantes en órganos de reserva también ha mostrado ser una estrategia muy efectiva, destacándose la expresión de la enterotoxina B termolabil de *Escherichia coli* con incrementos de 20,000 veces en comparación con los obtenidos en el citosol (Streatfield y col. 2003).

En general, las vacuolas líticas no son consideradas un sitio adecuado para la acumulación de proteínas recombinantes en plantas, debido a su alto contenido de proteasas (Goulet y Michaud 2006). Por lo contrario, las vacuolas de reserva son un compartimiento adecuado para la acumulación de proteínas, especialmente en semillas (Stoger y col. 2005, proteínas Petruccelli y col. 2006, Benchabane y col. 2008), donde son más abundantes (Müntz 1998, Park y col. 2004). La producción en semillas ofrece además la ventaja de que las proteínas pueden acumularse en un volumen pequeño y de manera estable por largos períodos a temperatura ambiente protegidos de la degradación (Kusnadi y col. 1997).

**Tabla 6: Nivel de acumulación de proteínas recombinantes localizadas en vacuolas**

	ESPECIE	TEJIDO	*RENDIMIENTO				REFERENCIA
			CITOSOL	RE	VACUOLA	APOPLASTO	
DP1B	<i>A. thaliana</i>	hoja	1	13	0	5	Yang y col. 2005
		semilla	1	7.8	5.4	0	
Enterotoxina B de <i>E. coli</i>	en granos maíz	semilla	1	100	20000	3300	Streatfield y col. 2003
hIGFBP-3-AFVY	tabaco	semilla			3 (800 ug/g FW)	1	Cheung y col. 2009
$\beta$ -glucosidasa humana	tabaco	semilla			200-500U/kg		Reggi y col. 2005
hGM-CSF	arroz				1.3%TSP		Sardana y col. 2007
prGCD	zanahoria				no reportado		Shaaltiel y col. 2007

**Referencia:** \*rendimiento relativo, comparado con el rendimiento del compartimiento control (valor unidad). Los distintos tejidos usados hojas (amarillo), semillas (verde) y células de zanahorias. AFVY: señal ctVSS de la faseolina.

La Tabla 6 presenta algunos ejemplos de proteínas recombinantes que han sido dirigidas a vacuolas. El análogo sintético de la proteína de seda de araña DP1B expresado en vacuolas de reserva de semillas de *Arabidopsis thaliana* mostró un incremento de 5.4 veces en comparación con su expresión en el citosol, pero no se detectó expresión en la vacuola central de hojas de la misma especie (Yang y col. 2005). La enterotoxina B sensible al calor de *E. coli* mostró un incremento de 20,000 veces en vacuolas de semillas de maíz en comparación con la acumulación obtenida en el citosol (Streatfield y col. 2003), por lo que este sistema de expresión es el de mayor rendimiento (10% TSP). La proteína de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina 3 (hIGFBP-3) que fue expresada en semillas de tabaco fusionada a la señal ctVSS de la proteína de reserva faseolina AFVY mostró un incremento en los niveles de acumulación en vacuolas de 3 veces con respecto a la versión secretoria, acumulándose en niveles de 0,08% FW (Cheung y col. 2009). La  $\beta$ -glucosidasa humana se acumuló en cuerpos de reserva-PSV en tabaco en niveles de 200-500U/kg semilla (Reggi y col. 2005). El factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos humano (hGM-CSF, *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) se acumula en PSV con un nivel de 1,3% TSP en arroz (Sardana y col. 2007). Por último, la expresión en células de zanahorias del gen codificante para la glucocerebrosidasa (prGCD) fusionada a la señal ctVSS de la quitinasa A de tabaco que dirige a vacuolas de reserva muestra una actividad semejante con la GCD comercializada e inclusive con glicanos de manosa terminales característico de glicofomas vacuolares que resultan adecuados para una óptima actividad y reclutamiento de macrófagos (Shaaltiel y col. 2007).

Con relación a los datos de anticuerpos acumulados en vacuolas en tejidos transgénicos el primer ejemplo es una IgA/G híbrida que se detecta en la vacuola central de hojas de tabaco. El estudio de esta proteína mostró que el tercer dominio constante de la cadena pesada de la IgA posee una secuencia responsable del direccionamiento vacuolar, que es la clase ssVSS que dirige vacuolas líticas. Como consecuencia de este direccionamiento la IgA/G expresada en tabaco sufrió una elevada degradación proteolítica (Frigerio y col. 2000). Las versiones secretoria y fusionada a la señal de ER KDEL del anticuerpo catalítico 14D9 se acumulan en el apoplasto y parcialmente en vacuolas de reserva de semillas transgénicas de tabaco, observándose en la extracción total del anticuerpo productos de clivaje proteolítico del mismo. En forma similar, con el mAb-14D9-KDEL, el anticuerpo 2G12-KDEL, también se acumula en órganos de reserva (cuerpos proteicos) en semillas de maíz (Rademacher y col. 2008).

En bibliografía hay dos ejemplos de inmunoglobulinas fusionadas a señales VSS expresadas en células vegetales en cultivo. Uno de ellos, es una inmunoglobulina de ratón fusionada a la señal ssVSS de esporamina de batata que incrementa los niveles finales de la glicofoma vacuolar Man3FucXylGlcNAc2 con respecto a la versión sin señal VSS, en cultivo de células de tabaco (BY2), pero este trabajo no informa los niveles de acumulación obtenidos (Misaki y col. 2011). Por otro lado, la expresión de inmunoglobulinas  $\gamma$ 1 y  $\gamma$ 4 específicas del factor de crecimiento transformante-beta (tgFB) fusionado a la señal ctVSS de la quitinasa



A en suspensión de células de zanahoria no mostraron niveles de acumulación detectables, en cambio las versiones secretorias y el uso de codones humanos si mostraron niveles detectables (Shaaltiel y col. 2009).

Teniendo en cuenta estos resultados la producción de proteínas recombinantes fusionadas a VSS requiere todavía de mayores estudios para efectivamente probar si la menor actividad proteolítica de PSV los transforma en un compartimiento apto para la acumulación de anticuerpos de interés.



# Objetivos



## **Objetivo General**

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar y evaluar una estrategia de direccionamiento a vacuolas de reserva como método para mejorar la acumulación de inmunoglobulinas completas en células vegetales. Con esta finalidad, por un lado, se propuso clonar a nivel molecular anticuerpos con aplicaciones potenciales en diagnóstico para ser empleados como inmunoglobulinas modelos. Por otro lado, se planteó la identificación de señales del receptor AtRMR1 que pudieran permitir un direccionamiento vacuolar más eficiente, independiente de interacciones ligando-receptor.

### **Los objetivos específicos fueron:**

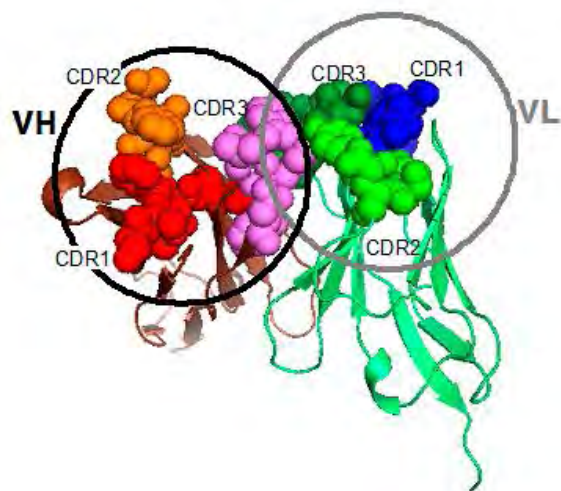
- Clonar a nivel molecular y secuenciar anticuerpos monoclonales con aplicaciones en diagnóstico.
- Expresar los anticuerpos clonados y evaluar su especificidad por el antígeno.
- Construir un gen reportero con señales derivadas del receptor de direccionamiento vacuolar de arabidopsis AtRMR1.
- Evaluar la capacidad de estas señales de dirigir a la proteína reportera a vacuolas en sistemas de expresión temporal y estable en plantas.
- Evaluar la capacidad de estas señales de dirigir a la proteína reportera a vacuolas en distintos órganos y tejidos.
- Caracterizar el camino seguido por esta proteína reportera en la vía secretoria.
- Expresar en plantas uno de los anticuerpos con aplicaciones en diagnóstico completo fusionado a distintas señales de direccionamiento vacuolar, incluidas las derivadas el receptor AtRMR1.
- Evaluar la eficiencia de las señales de direccionamiento vacuolar en incrementar la acumulación del anticuerpo expresado en hojas.



# Resultados



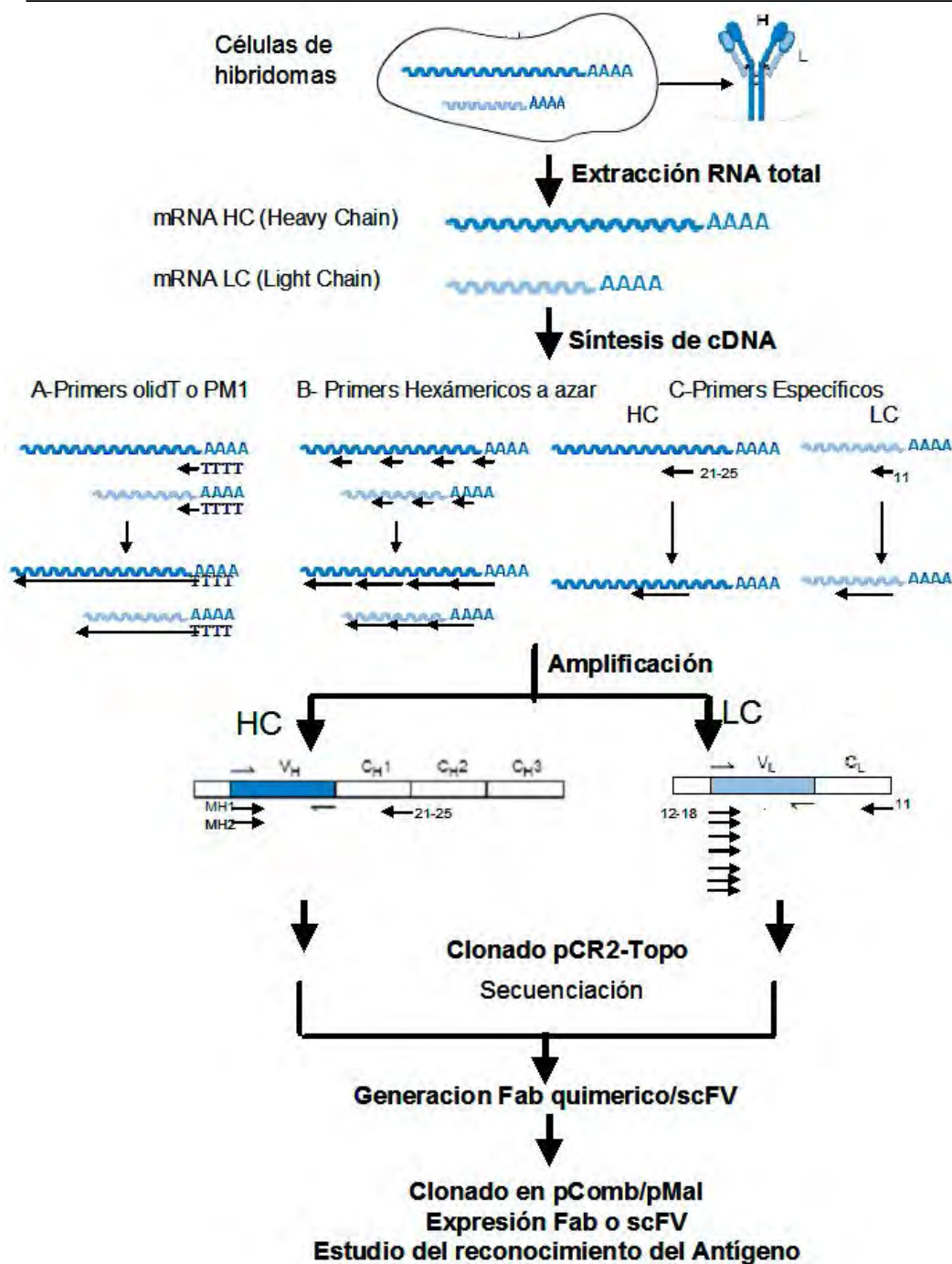
# Capítulo I: “Clonado molecular y análisis funcional de anticuerpos con potenciales aplicaciones en diagnóstico”



## CAPITULO I:

**“CLONADO MOLECULAR Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE ANTICUERPOS  
CON POTENCIALES APLICACIONES EN DIAGNÓSTICO”****I. Introducción**

El objetivo de esta parte del trabajo fue clonar a nivel molecular anticuerpos con aplicaciones potenciales en diagnóstico partiendo de hibridomas generados en el laboratorio del Dr. Fernando Chirido (Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP). Por un lado se utilizó el hibridoma 2G3 que produce un anticuerpo específico de transglutaminasa tisular humana (htTG), proteína de utilidad para el desarrollo de métodos de screening de enfermedad celíaca (EC) (Agardh y col. 2005, Fernández y col. 2005, Prince 2006, Ocmant y Mascart 2007). El anticuerpo 2G3 será utilizado para mejorar la recuperación de htTG recombinante, ya que por sus efectos tóxicos es una proteína que se acumula en niveles muy bajos en distintos sistemas de expresión, lo que dificulta su purificación (Di Niro y col. 2005, Sorrentino y col. 2005, Sorrentino y col. 2009). Los otros dos hibridomas son el 1B4E9 y 3B4H1 que producen anticuerpos de utilidad en la certificación de alimentos libres de gluten. Este tipo de ensayos requiere contar con inmunoglobulinas que reconozcan con alta sensibilidad y especificidad las prolaminas de trigo, cebada, centeno y avena (Sorell y col. 1998). El mAb 1B4E9 reconoce con una intensidad similar a las prolaminas de trigo: gliadinas alfa, beta, gamma y omega y también a las prolaminas de cebada y centeno, mientras que el mAb 3B4H1 solamente reconoce a las prolaminas de trigo y de avena (Rumbo y col. 2000). El contar con estos anticuerpos clonados y un sistema de producción de los mismos empleando plantas permitirá en un futuro mejorar los métodos de cuantificación de prolaminas en alimentos ya sea por multimerización y/o generación de moléculas biespecíficas. La estrategia general planteada para el clonado molecular de estos anticuerpos se presenta en la Figura I.1. El objetivo fue amplificar y clonar a nivel molecular los genes codificantes para la los dominios variables y constante 1 de la cadena pesada (VH-CH1) y la cadena liviana completa (VL-CL), para posteriormente introducir las en un vector de expresión en bacterias que permitiera verificar el reconocimiento del antígeno antes de pasar a sistema de expresión en plantas.



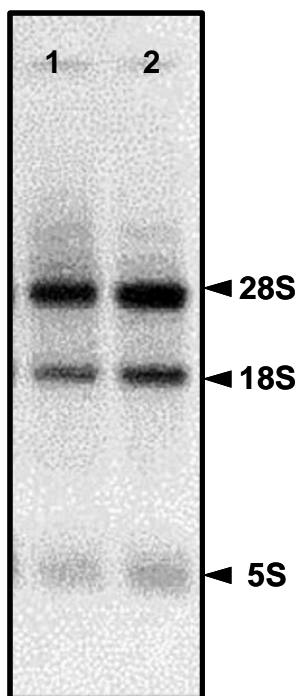
**Figura I.1: Estrategia general de clonado de los anticuerpos.**

(1) Extracción de RNA total del hibridoma correspondiente (2) Síntesis de cDNA empleando tres tipos de oligonucleótidos diferentes: oligo dT, hexámicos al azar y específicos de las regiones constantes de las cadenas livianas y pesadas. (3) Amplificación de los genes codificantes para la cadena liviana (LC) y para la cadena pesada (HC). La amplificación de HC se realizó con los juegos de primers directos F-MH1 y F-MH2 (Wang y col. 2000) y reversos para amplificar inmunoglobulinas gammas de varios isotipos denominados primers 21-25 (Barbas 1991, Engberg 1996). La amplificación de LC se obtuvo con primers directos denominados 12-18 y primers reversos específicos 11 (Barbas 1991). (5) Los productos de PCR amplificados fueron clonados en el vector pCRI-TOPO-TA® (Invitrogen). (6) Los clones seleccionados con estos primers específicos internos fueron secuenciados en MacroGen Inc. (7) Para analizar la funcionalidad de los fragmentos de los mAbs clonados se realizan subclonados en tres vectores diferentes: pComb3H, pComb3X y el pMalPSS y generan versiones Fab quiméricas y scFV del mismo, para llevar a cabo la expresión de los mAbs en *E.coli*.

I. Resultados

I.1 Clonado molecular de los anticuerpos 2G3, 1B4E9 y 3B4H1

Se partió aproximadamente de un millón de células de los hibridomas 2G3, 1B4E9 y 3B4H1 y se extrajo RNA total empleando distintos métodos como se detalla en el capítulo de materiales y métodos. La calidad de las preparaciones de RNA fue verificada por electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes donde se confirmó la integridad de los RNA ribosomales 28S, 18S y 5S como puede observarse en la Figura I.2.



**Figura I.2: Análisis de la calidad de las preparaciones de RNA.**

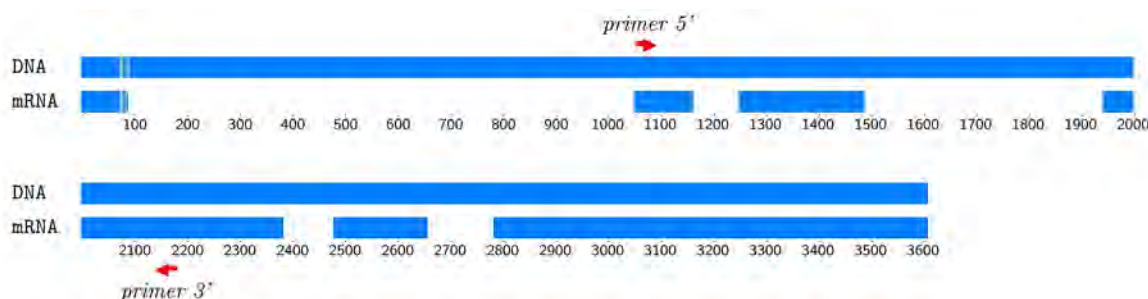
El RNA total aislado de células de los hibridomas 2G3 y 1B4E9, (calles 1 y 2, respectivamente), fue separado por electroforesis en geles de agarosa 1.2% (w/v) conteniendo 2.4 M formaldehído. Puede observarse la integridad de los RNA ribosomales 28S, 18S y 5S.

Estas preparaciones de RNA total fueron utilizadas como molde para obtener cDNA empleando tres tipos de oligonucleótidos diferentes: oligo dT, hexámicos al azar y específicos de las regiones constantes de las cadenas livianas y pesadas (detallados en la Tabla M.1). Para verificar que el RNA extraído no tuviera restos de DNA cromosomal, los cDNA obtenidos fueron amplificados por PCR empleando primers específicos del gen de la  $\beta$ -actina. Estos primers fueron diseñados de forma tal que incluyeran una región del gen de la  $\beta$ -actina que contenga intrones, y por ende generara productos de distinto tamaño si en la preparación hubiera DNA cromosomal (1000 pb) además del RNA mensajero procesado (550pb) (Figura I.3A). El resultado obtenido al amplificar los distintos cDNAs de los hibridomas 2G3 y 1B4E3 con los primers de la  $\beta$ -actina se

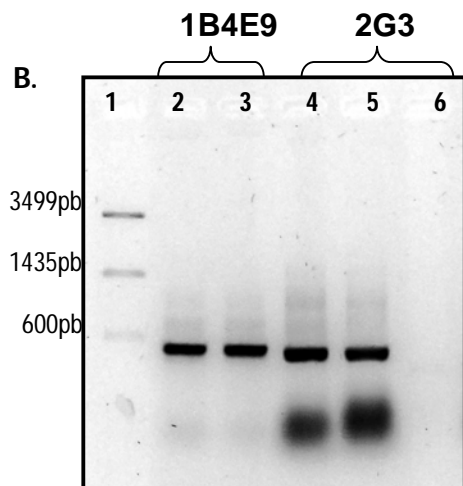


presenta en la Figura I.3B. Puede observarse la amplificación de un fragmento de aproximadamente 550 pb, cuando se utiliza como molde los cDNAs sintetizados con primers hexaméricos al azar y oligo-dT de ambos hibridomas. Este resultado permite concluir que los cDNAs se sintetizaron con éxito y además que la preparación de RNA total estaba libre de DNA genómico que hubiera generado un producto de PCR de aproximadamente 1000 pb (Figura I.3A). Además, se observa que no hay amplificación de  $\beta$ -actina cuando se utiliza como molde cDNA sintetizados con los primers específicos de inmunoglobulinas (Figura I.3B, calle 6).

A.



B.

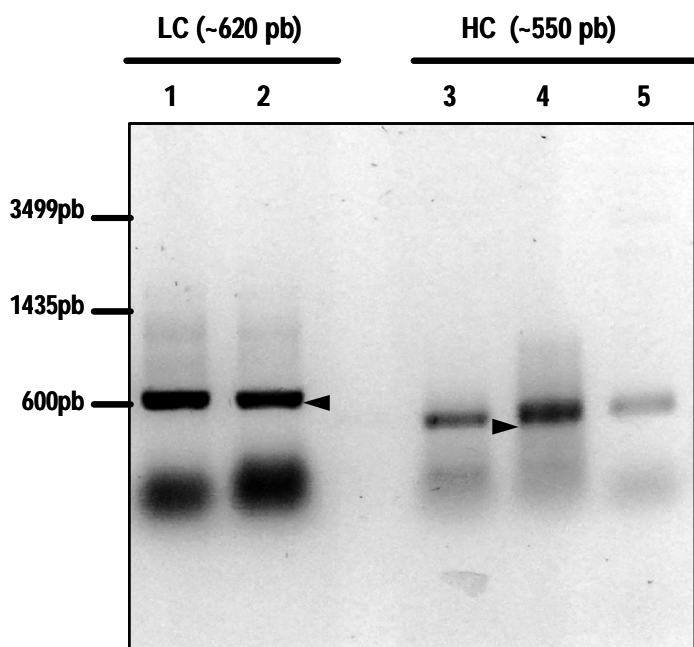


**Figura I.3: Análisis de la calidad de los cDNA por PCR con primers específicos para la  $\beta$ -actina.**

**A.** Estructura del gen de la  $\beta$ -actina y sitios de apareamiento de los primers diseñados. **B.** Separación de los productos de amplificación de los moldes de cDNAs del hibridoma 1B4E9 y 2G3 con los primers de  $\beta$ -actina. calle 1: marcador de peso molecular en pb, calle 2 y 4: cDNA con primers hexaméricos al azar, calle 3 y 5: cDNA con primer oligo dT y calle 6: cDNA con primers específicos de las zonas variables de las cadenas de anticuerpos

Confirmada la calidad de los distintos cDNAs se procedió a la amplificación de los genes codificantes para la cadena liviana LC (VL-CL) y dos dominios de la cadena pesada HC (VH-CH1) (Figura I.4), empleando las mezclas de primers descritos en Figura I.1 (Barbas I y col. 1991). La LC del hibridoma 2G3 se logró amplificar de preparaciones de cDNA con primers hexaméricos empleando el primer reverso 11 y la mezcla de primers directo 12-18 (Figura I.4, calle 1). La LC del hibridoma 1B4E9 se obtuvo del cDNA sintetizado con primers específicos (primer reverso 11), usando para la amplificación los primers directos mezcla 12-18 y el reverso 11 (Figura I.4, calle 2). La LC del hibridoma 3B4H1 no pudo ser amplificada. La amplificación de la HC partiendo de los distintos cDNAs, con los primers descritos en Barbas I y col. 1991 (Table M.1, 2-10), no dio resultados positivos. Para resolver el problema de la amplificación de HC se recurrió a otros juegos de

primers: por un lado se adoptaron los primers directos altamente degenerados F-MH1 y F-MH2 (Wang y col. 2000) y por otro lado se incluyeron primers reversos para amplificar inmunoglobulinas gammas de varios isotipos: primers 21-25 (Orum y col. 1993, Engberg y col. 1996). Estos últimos primers están diseñados sobre el final del dominio CH1 y la zona de la bizagra, y permitirían amplificar la mayor parte de los alelos de inmunoglobulinas gamma murinas disponibles en IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)). Estos primers fueron modificados para incorporarles los sitios de restricción que permitieran los clonados posteriores (Table M.1, primers 21-25)



**Figura I.4: Amplificación de los genes codificantes para la cadena liviana (LC) y para la cadena pesada (HC) del 1B4E9.**

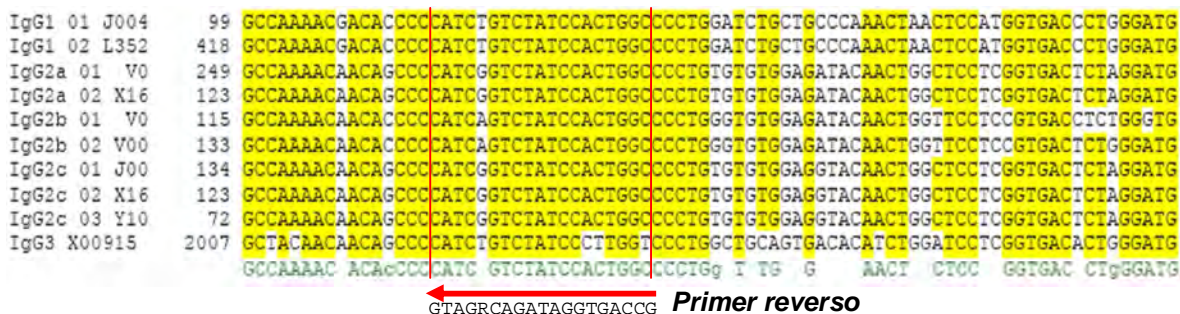
En las calles 1 y 3, se utiliza como molde el cDNA obtenido con primers hexaméricos al azar.

En las calles 2 y 4, se utiliza como molde el cDNA obtenido con los primers específicos reverso 11 (calle 2) y reverso 21-25 (calle 4). Como control positivo se utilizó la cadena gamma 1 del anticuerpo 14D9 (calle 5).

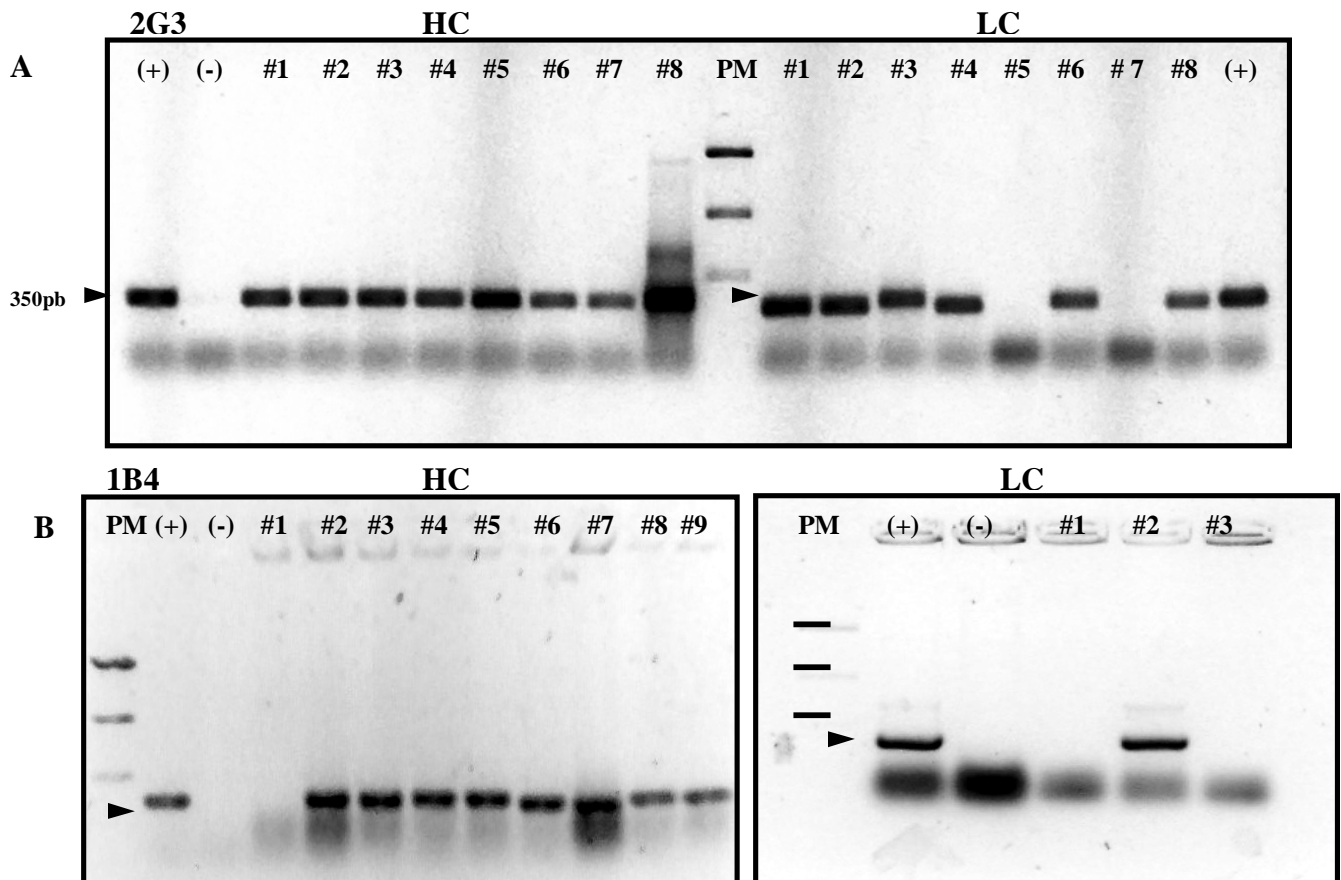
Las mezclas de primers empleadas: para LC los primers directo 12-18 y reverso Pr1; para HC los primers directo F-MH1 y F-MH2 y reverso 21-25.

La Figura I.4 (calles 3 y 4) muestra los resultados obtenidos al amplificar HC usando como molde los cDNA del hibridoma 1B4E9 con los juegos de primers directos F-MH1 y F-MH2 y reversos 21-25. En la amplificación de HC puede observarse que tanto el molde de cDNA obtenido con primers hexaméricos como específicos (primers 21-25) generan un producto de PCR aproximadamente de 550pb. El amplicón de tamaño adecuado se obtiene cuando el molde es con el cDNA de primers específicos (Figura I.4, calle 4). Se observa también la amplificación de la HC del mAb 14D9 (Petruccelli y col. 2006) empleado como control positivo (Figura I.4, calle 5). La amplificación de la LC del hibridoma 1B4E9 se logró amplificar de preparaciones de cDNA con primers hexaméricos y primers específicos y generó un producto de PCR aproximadamente de 620pb. La HC del hibridoma 3B4H1 y 2G3 pudo ser amplificada con estos mismos juegos de primers (datos no mostrados).

Los productos de PCR amplificados fueron clonados en el vector pCRII-TOPO-TA<sup>®</sup> (Invitrogen) por su eficiencia. El mapeo por restricción de los clones mostró que se habían clonado fragmentos de distinto tamaño por lo que previo a la secuenciación se decidió hacer un screening de las colonias con primers internos específicos de inmunoglobulinas de ratón. Con esta finalidad se diseñaron primers internos reversos haciendo uso de las secuencias genómicas de ratón disponibles en la base de IMGT. La Figura I.5 muestra el alineamiento del inicio del CH1 de los distintos alelos de cadenas gamma murinos disponibles en IMGT y la zona escogida para diseñar un primer reverso 3IgGCH1 que permitiera amplificar los distintos alelos, cuya secuencia también se muestra en la Figura I.5. De la misma manera se utilizó el primer reverso interno R-K3 (Tabla M.1) para seleccionar los clones LC a ser secuenciados. Los resultados obtenidos luego de la amplificación de los clones LC y HC en pCRII-TOPO-TA, con los primers internos específicos se muestran en la Figura I.6. Puede observarse que la mayoría de los clones de la HC fueron positivos en comparación con los de LC. Los clones seleccionados con estos primers específicos internos fueron secuenciados en Macrogen Inc. (Seoul, Corea). Para cada hibridoma se secuenciaron al menos dos clones verificándose que tenían la misma secuencia, aún en aquellos casos que se había partido de distintos cDNAs.



**Figura I.5:** Alineamiento de la secuencia de nucleótidos correspondiente al inicio del dominio CH1 de las distintas clases de inmunoglobulinas gamma de ratón: Ig G1, G2a, 2b, 2c y G3. Los alelos utilizados en el alineamiento de acuerdo a la base de datos IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)) son: IgG1\*01 J00453, IgG1\*02 L35252, IgG2a\*01 V00825, IgG2a\*02 X16997, IgG2b\*01 V00763, IgG2b\*02 V00801, IgG2c\*01 J00479, IgG2c\*02 X16998, IgG2c\*03 Y10606, IgG3\*01 X00915. Los nucleótidos idénticos se resaltan en amarillo, y en verde se indica la secuencia consenso. La flecha indica la región donde se aparee el primer reverso 3IgGCH1: GCCAGTGGATAGACRGATG que amplifica un fragmento de alrededor de 400 pb con los primer F-MH1 y MH2.



**Figura I.6:** Análisis de identidad de los clones HC y LC obtenidos con cDNA primer específico en pCRII-Topo TA con primers internos. En el caso de la cadena liviana (LC) con el primer internos K3 y para la cadena pesada (HC) con el primer 3IgGCH1 para **A.** 2G3 y **B.** 1B4E9. PM: patrón de peso molecular: 3499pb, 1435pb y 600pb.

## I.2 Análisis de las secuencias de los dominios variables de las inmunoglobulinas amplificadas

Las secuencias de los dominios variables de las inmunoglobulinas clonadas fueron analizadas mediante BLASTX (*Translated Basic Local Alignment Search Tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) determinándose que se traducían en un marco de lectura con similitud con inmunoglobulinas murinas, y que dicho marco era continuo, es decir que no poseían codones de terminación internos. Empleando la base de datos de inmunogenes IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)) se analizaron los determinantes de complementariedad (CDRs) y las regiones más conservadas que los flanquean llamadas FR (*framework*), verificándose la ausencia de arreglos V-J y V-D-J no funcionales (pseudogenes) en los dominios variables pesados (VH) y livianos (VL) de los anticuerpos 2G3 y 1B4E9. El dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo 3B4H1 presenta un arreglo particular.

En la Tabla I.1 se resume los resultados del análisis de secuencia de los clones de las HC y LC amplificadas por PCR y clonados en el pCRII-TopoTA para los distintos hibridomas. Se observa que utilizando el molde de cDNAs generado con primers reverso específicos 21-25 se obtuvo la amplificación de la cadena pesada, con dominios variables de rearreglo productivo, para los tres anticuerpos. La amplificación de la cadena pesada con un dominio variable de arreglo productivo fue exitosa utilizando como moldes tanto el cDNA obtenido con hexámeros como con primers reversos específicos 11. Por lo contrario, aunque el cDNA generado con oligo-dT era de buena calidad no resultó útil para la amplificación de genes de inmunoglobulinas. El primer directo que mejor anduvo para la amplificación de la cadena pesada fue el F-MH2 y para la cadena liviana fue el 18 y 17.

**Tabla I.1: Resultados del análisis de secuencia de los clones de las cadena pesada y liviana amplificadas por PCR y clonadas en pCRII-TopoTA**

Gen / clon	cDNA obtenido con	Primer Directo	Primer Reverso	Rearreglo productivo
Gamma 2G3 #1	Hexámeros	F-MH2	Primer 25	Si
Gamma 2G3 #2	Hexámeros	F-MH2	Primer 25	Si
Gamma 2G3 # 3	Primers específicos 21-25	F-MH2	Primer 25	Si
Kappa 2G3 #2	Hexámeros	Primer 18	Primer 11	Si
Kappa 2G3 #4	Hexámeros	Primer 18	Primer 11	Si
Kappa 2G3 #6	Hexámeros	Primer 18	Primer 11	Si
Gamma 1B4E9 #2	Primers específicos 21-25	F-MH2	Primer 25	Si
Gamma 1B4E9 #4	Primers específicos 21-25	F-MH2	Primer 24	Si
Kappa 1B4E9 # 1	Primer específico 11	Primer 17	Primer 11	Si
Kappa 1B4E9 # 2	Primer específico 11	Primer 18	Primer 11	Si
Gamma 3B4H1 #2	Primers específicos 21-25	F-MH2	Primer 21	Sin elemento D
Gamma 3B4H1 #15	Primers específicos 21-25	F-MH2	Primer 21	Sin elemento D

En la Tabla I.2 se presenta un resumen de la información obtenida de comparar la secuencia de aminoácidos de los dominios de las cadenas livianas y pesadas clonadas con la traducción de los genes *IgL* e *IgH* de la línea germinal más próxima. Los genes *IgL* de ratón están constituidos por segmentos de genes variables (V) y de unión (J) que se agrupan en familias: 19 familias  $V_k$  (164 miembros), 3 familias  $V_\lambda$  (3 miembros), 1 familia  $J_k$  (5 miembros) y 1 familia  $J_\lambda$  (5 miembros), mientras que los genes *IgH* poseen 16 familias  $VH$  (350 miembros) y 1 familia  $JH$  (4 miembros), además de los segmentos D (Lefranc 2003, Lefranc y col. 2005, Lefranc y col. 2009, Rohatgi y col. 2008). La Tabla I.2 muestra que las cadenas livianas son de tipo kappa de las familias V IGKV1 e IGKV5 y de las J IGKJ2 y IGKJ4 y que el porcentaje de identidad con respecto al alelo de la línea germinal de ratón más cercano es alto (el alelo empleado en la comparación está indicado en la tabla). Las cadenas pesadas derivan de las familias V: IGHV1, IGHV5 e IGHV9 y de la familia J IGHJ2, que presentan un alto porcentaje de identidad, excepto la cadena gamma 3B4H1. En la Tabla I.3 se detalla la longitud de las regiones de los FRs y CDRs, y el número de aminoácidos mutados con relación al alelo de la línea germinal más cercano, que son producto de mutaciones somáticas que ocurren durante el proceso de maduración de afinidad de linfocitos B. Puede observarse que el número de mutaciones es reducido y que dependiendo del gen analizado se encuentran mayoritariamente en los FR (por ejemplo kappa 2G3 y gamma 2G3) o en los CDRs (ejemplo gamma 1B4E9). Una de las características del anticuerpo 2G3 es que el CDR1 de la cadena liviana es largo (11 aminoácidos). En cambio el CDR1 de la cadena liviana del anticuerpo 1B4E9 posee sólo 6 aminoácidos, mientras que su CDR 3 es largo.

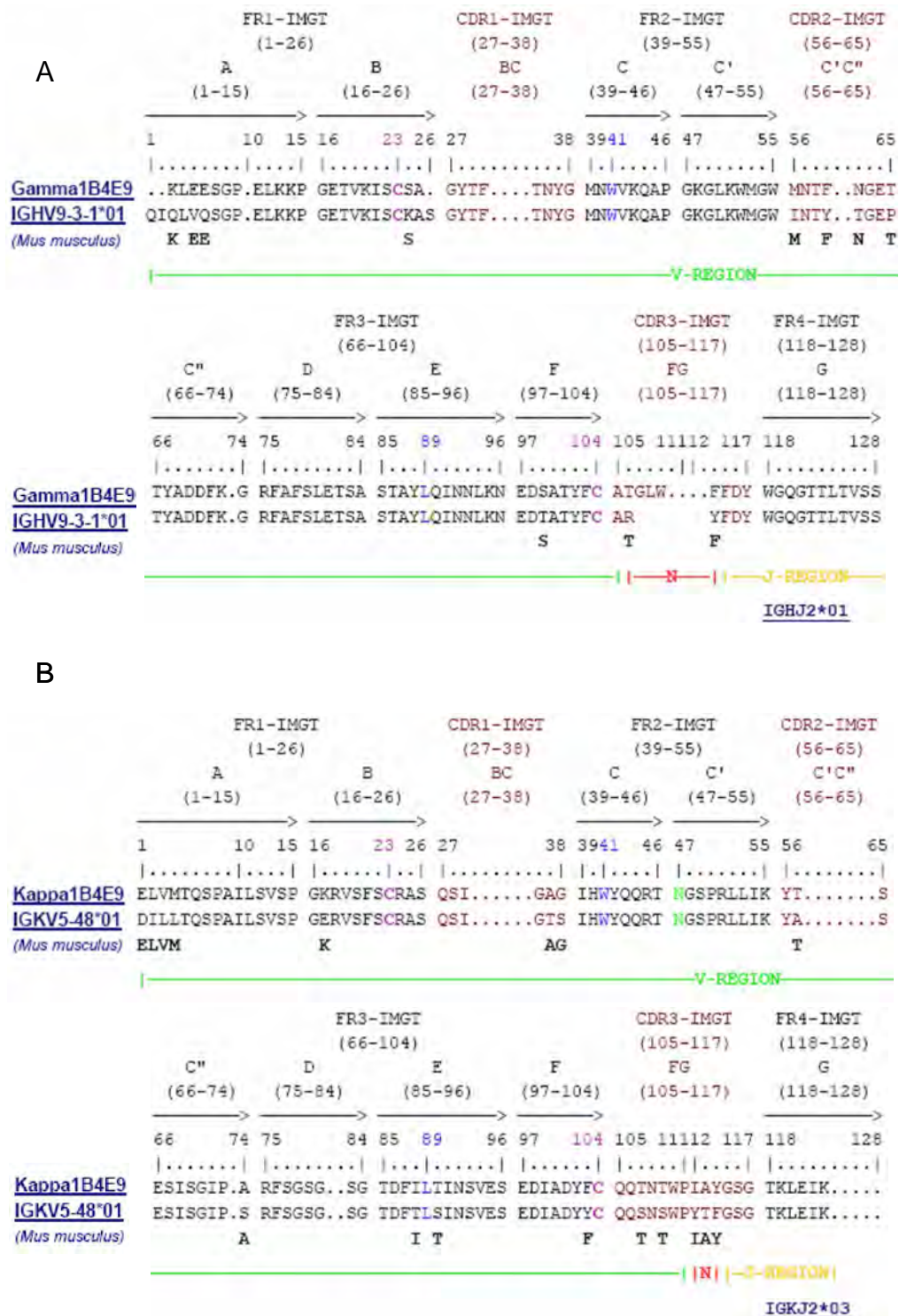
**Tabla I.2: Alelos que dieron origen a los reordenamientos de los dominios variables livianos (VL) y pesados (VH) de los anticuerpos clonados.**

Secuencia	Línea Germinal Variable (V) más cercana			Línea Germinal Joining (J) más cercana		
	Nombre del Alelo	Número de Acceso	Porcentaje de Identidad	Nombre del Alelo	Número de Acceso	Porcentaje de Identidad
Kappa2G3	IGKV1-117*01	D00081	92,0	IGKJ4*01	V00777	100
Gamma2G3	IGHV1-14*01	AC090843	88,8	IGHJ2*01	X63166	92,3
Kappa1B4E9	IGKV5-48*01	V01564	85,3	IGKJ2*03	M27036	90
Gamma1B4E9	IGHV9-3-1*01	AJ851868	89,5	IGHJ2*01	V00770	93,3
Gamma3B4H1	IGHV5-17*02	U04229	94,0	IGHJ2*02	S73821	66,7

**Tabla I.3: Longitud de las regiones FR y determinantes de complementariedad (CDRs) de los dominios variables livianos (VL) y pesados (VH) clonados**

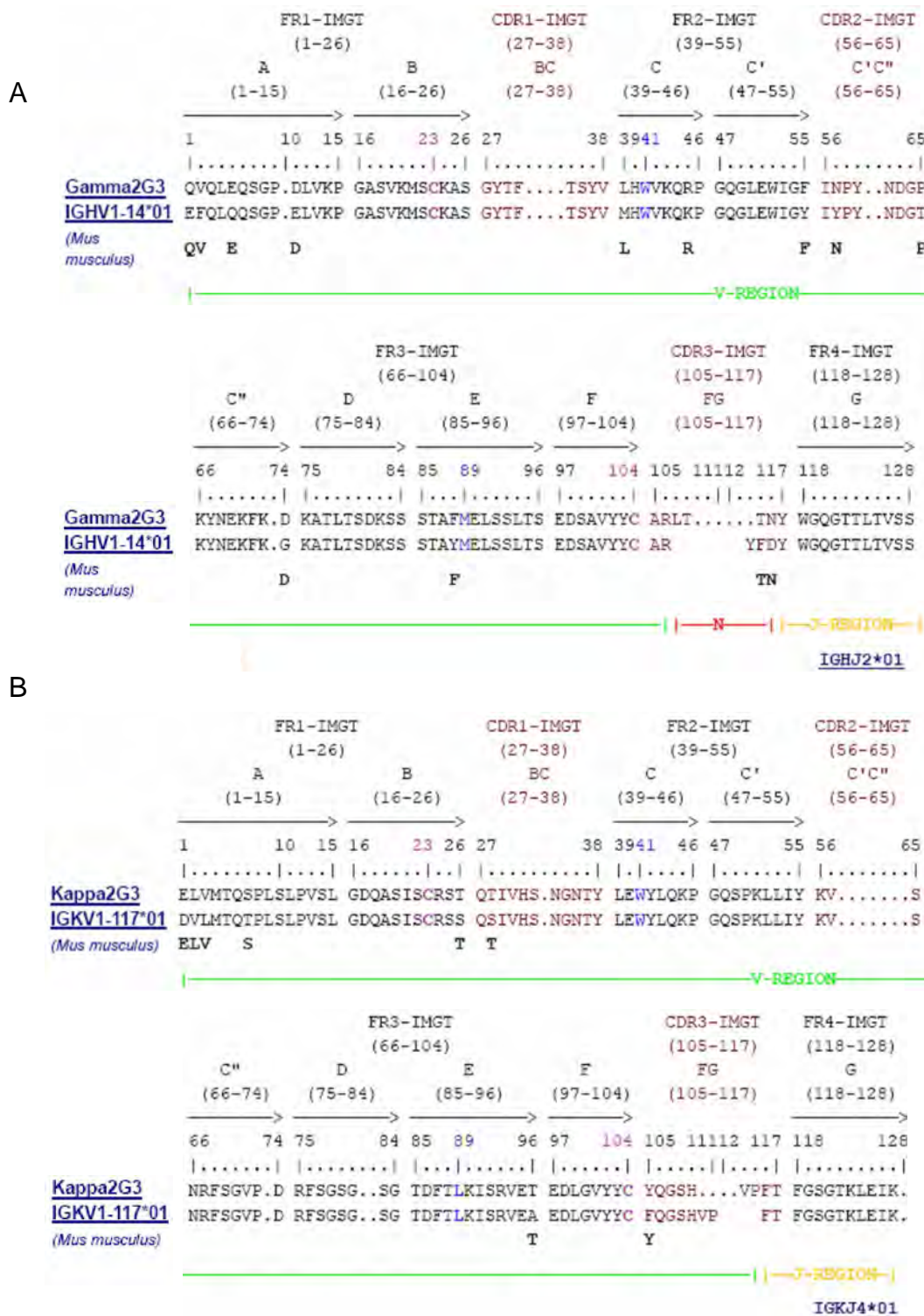
Secuencia	Longitud de los CDR (1.2.3)	Número de aminoácidos diferentes en los CDR1 y CDR2	Longitud de los FR en AA (1.2.3.4)	Número de AA diferentes en los FRs	Número total de AA diferentes en el Dominio Variable
Kappa2G3	[11.3.9]	1	[26.17.36.10] = 89 AA	6	7
Gamma2G3	[8.8.7]	2	[25.17.38.11] = 91 AA	9	11
Kappa1B4E9	[6.3.13]	3	[26.17.36.6] = 85 AA	9	12
Gamma1B4E9	[8.8.8]	4	[22.17.38.11] = 88 AA	5	9
gamma3B4H1	[8.8.]	1	[25.17.38.0]= 80 AA	17	18

El alineamiento de las regiones variables de la cadena pesada y liviana del anticuerpo 1B4E9 y 2G3 con los alelos del directorio de dominios variables más cercanos obtenido haciendo uso de IMGT/DomainGapAlign se muestra en las Figuras I.7, I.8 y I.9 (Kaas y col. 2007, Ehrenmann y col. 2010, Ehrenmann y Lefranc 2011). El alineamiento permite observar la distribución de las mutaciones en las hojas beta que forman los distintos FR y también las mutaciones y deleciones en los CDRs. Los CDRs 1 y 2 de los distintos genes clonados pertenecen a la misma estructura canónica que los FR, concordando con el hecho de que a pesar de la mayor variabilidad de los CDRs existe un número reducido de estructuras espaciales que puede ser estabilizada por cada FR (Chothia y Lesk, 1987, Chothia y Finkelstein 1990, Tramontano y col. 1990). Los residuos de aminoácidos que aparecen en otro color son absolutamente indispensables para el plegamiento correcto del FR, verificándose que los mismos están conservados en los genes clonados. En particular se destacan las cisteínas que estabilizan los distintos FR ya sea de las cadenas pesadas o livianas y que forman uniones disulfuro entre las hojas beta. Es de destacar que algunas de las variaciones con respecto a la línea germinal, probablemente se deban a la estrategia empleada en el clonado ya que los primers directos coinciden con el inicio del FR1. En el caso de las cadenas kappa, el primer 18 introduce un sitio de restricción para permitir los subclonados posteriores y por su ubicación puede modificar los 4 primeros aminoácidos del FR1. En el caso de las cadenas gammas, el primer F-MH2 al ser altamente degenerado también introduce cambios que se extienden en toda la zona de apareamiento, pero puede observarse que los FR1s de 1B4E9, 2G3 y 3B4H1, poseen únicamente 3, 4 y 3 mutaciones, respectivamente.

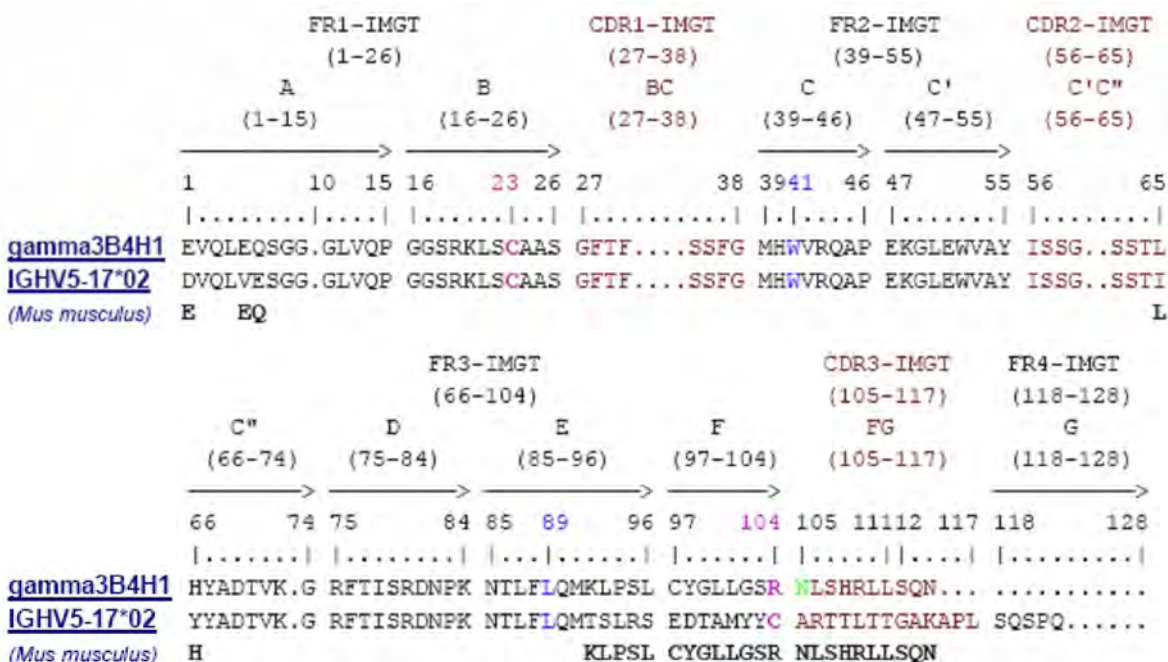


**Figura I.7:** Alineamiento de las regiones variables de la cadena pesada (parte A) y liviana (parte B) del anticuerpo específico de gliadinas 1B4E9 con los alelos del directorio de dominios V de IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)) con la línea germinal más cercana. Se muestran los distintos FR (*framework region*) indicándose las estructuras secundarias y las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Los residuos de aminoácidos absolutamente conservados y requeridos por el correcto plegamiento de los framework aparecen indicados. Los aminoácidos diferentes con respecto a la línea germinal se destacan en línea inferior del alineamiento. El alineamiento se realizó utilizando "IMGT-GAP" (Ehrenmann y col. 2010, Ehrenmann y Lefranc, 2011).





**Figura I.8:** Alineamiento de las regiones variables de la cadena pesada (parte A) y liviana (parte B) del anticuerpo específico de hTG 2G3 con los alelos del directorio de dominios V de IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)) con la línea germinal más cercana. Se muestran los distintos FR (*framework region*) indicándose las estructuras secundarias y las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Los residuos de aminoácidos absolutamente conservados y requeridos por el correcto plegamiento de los framework aparecen indicados. Los aminoácidos diferentes con respecto a la línea germinal se destacan en línea inferior del alineamiento. El alineamiento se realizó utilizando "IMGT-GAP" (Ehrenmann y col. 2010, Ehrenmann y Lefranc 2011).



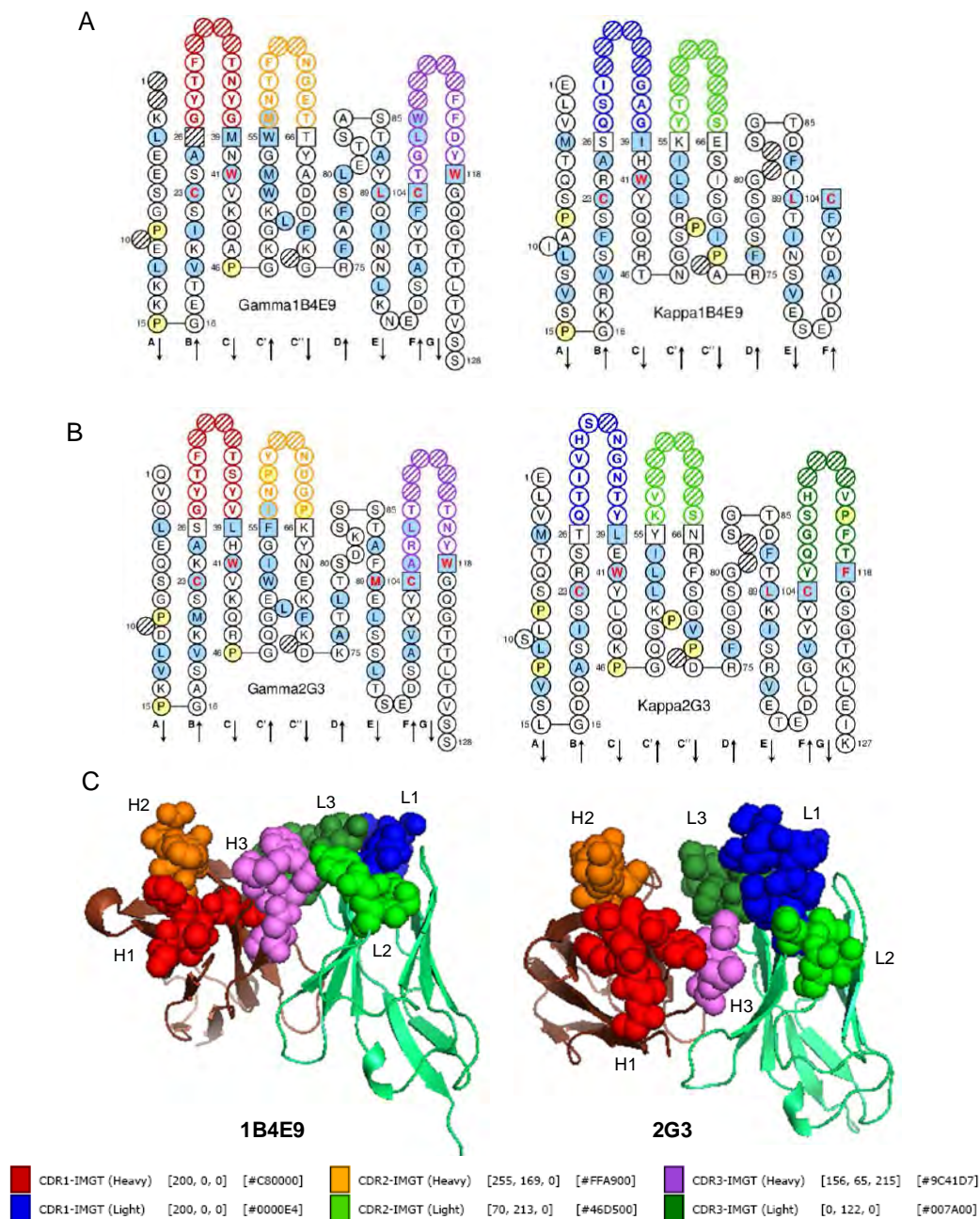
**Figura I.9:** Alineamiento de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo específico de gliadinas 3B3H1 con el alelo del directorio de dominios V de IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)) más cercano. Puede observarse las diferencias a partir del residuo de aminoácido 104 que indica que la secuencia clonada carece de dominio D ocurriendo directamente una recombinación FR-J. El alineamiento se realizó utilizando "IMGT-GAP" (Ehrenmann y col. 2010, Ehrenmann y Lefranc 2011).

En la Figura I.10 se presenta el diagrama de perlas de los dominios variables pesados y livianos de los anticuerpos 1B4E9 y 2G3 mostrando la distribución espacial que tendrían los CDRs lo que permite identificar los aminoácidos que serían más relevantes para la interacción antígeno-anticuerpo (Kaas y col. 2004, Ehrenmann y col. 2011). El diagrama también muestra los residuos de aminoácidos de los FR importantes para el plegamiento del dominio variable (resaltados en rojo). En la misma figura se muestran los modelos de estructura tridimensional obtenidos en el servidor PIGS (PIGS: *Automatic Prediction of ImmunoGlobulin Structures*, <http://www.biocomputing.it/pigs/>) que permite apreciar la distribución en el espacio de los CDRs y los espacios en los que se ubicaría el antígeno (Marcatili y col. 2008). Puede observarse que el anticuerpo 2G3 posee en el sitio de reconocimiento del antígeno un bolsillo mucho más grande que lo observado para el anticuerpo 1B4E9, lo que está de acuerdo con el mayor tamaño del CDR1 ó L1. El anticuerpo 1B4E9 posee una superficie de unión al antígeno menos profunda.

La Tabla I.4 presenta los elementos que son importantes para la recombinación que genera el CDR3 de las cadenas pesadas. Puede observarse las secuencias de la región V del extremo 3' y de la región J 5' involucradas en la recombinación y de las familias D que generan el CDR3 de las gamma 1B4E9 y 2G3. La base de datos IMGT no pudo reconocer el CDR3 de la cadena gamma 3B4H1 como puede apreciarse en la Figura I.9. La Tabla I.4 muestra los nucleótidos que han sido adicionados por deoxinucleotidil transferasa terminal que incorpora secuencias cortas durante la recombinación D-J y la unión de V a D-J de las cadenas pesadas. En el caso de la cadena gamma 3B4H1, aunque su reordenamiento fue inicialmente identificado como no funcional por IMGT, el alineamiento de esta secuencia mostró una identidad casi completa con las cadenas pesadas de varios anticuerpos funcionales como puede observarse en la Figura I.11. La cadena gamma 3B4H1 presenta un reordenamiento particular en el que pierde la región D y que ha sido descrito en otros anticuerpos funcionales (Rohatgi y col. 2009).

**Tabla I.4: Secuencias que intervienen en la recombinación V J D y nucleótidos adicionados por la deoxinucleotidil transferasa terminal que genera el CDR3 de las cadenas pesadas**

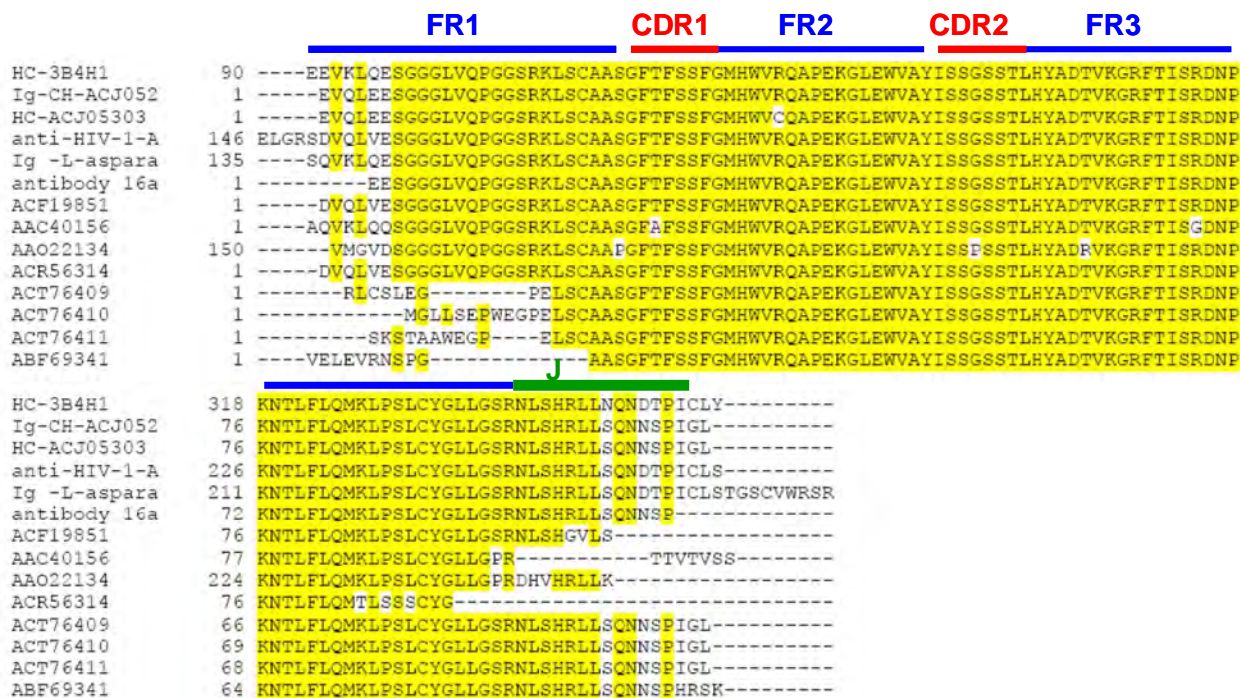
Secuencia	Alelo V	3'V-REGION	N1	D-REGION	N2	5'J-REGION	Alelo J	Alelo D
Gamma 1B4E9	IGHV9-3-1*01	tgtgcaa..	Cgggt	....ctatggt....		....cttgactactgg	IGHJ2*01	IGHD2-2*01
Gamma 2G3	IGHV1-14*01	tgtgcaaga	C	....ttactacg....	a	.....actactgg	IGHJ2*01	IGHD1-2*01
Gamma 3B4H1	IGHV5-17*02 F						IGHJ2*02	



**Figura I.10: Distribución espacial de los CDRs de los anticuerpos 1B4E9 y 2G3.**

Partes A y B: diagramas de perlas de los VH y VL de los mAAb 1B4E9 (panel A) y 2G3 (panel B). Las cadenas pesadas se muestran a la derecha y las livianas a la izquierda. Los CDRs aparecen indicados en distintos colores cuyo código aparece en la parte inferior de la figura. Los diagramas de perlas fueron generados en la base de datos IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)). En rojo se resaltan los residuos de aminoácidos de los FR importantes para el plegamiento del dominio variable.

Parte C: estructura tridimensional de los dominios variables de los anticuerpos 1B4E9 y 2G3. Los modelos fueron generados en PIGS (<http://www.biocomputing.it/pigs/>) empleando el mejor modelo y la figura mostrada fue generada utilizando PyMol Molecular Graphics System (Delano Scientific LLC). Los CDRs de las cadenas livianas (L) y pesadas (H) se indican con el número correspondiente, empleando el mismo código de colores que en los diagramas de perlas. La cadena liviana se muestra en verde y la pesada en color chocolate



**Figura I.11: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del 3B4H1 a partir del primer aminoácido del FR1 con otras HC que muestran el mismo reordenamiento en que ocurre una combinación directa del FR3 con el J perdiéndose la secuencia D.** Los números de acceso/función inmunoglobulina son: Ig-CH-ACJ052 (contra Galactoxylomannan), HC-ACJ05303 (contra Galactoxylomannan), anti-HIV-1 (AAC28091), Ig -L-asparaginase (AAA62276), antibody 16a (anticuerpo monoclonal de Mycobacterium tuberculosis CDC 1551, ABS20005), ACF19851 (contra virus mosaico Cymbidium), AAC40156 (contra factor de activador de la transcripción), AAO22134 (contra antígeno células B humanas CD20), ACR56314 (anticuerpo específico de Streptococcus pneumoniae Serotype 8), ACT76409 (anticuerpo neutralizante contra toxina edema), ACT76410 (anticuerpo neutralizante contra toxina edema), ACT76411 (anticuerpo neutralizante contra toxina edema), ABF69341 (anti toxina de Bacillus anthracis).

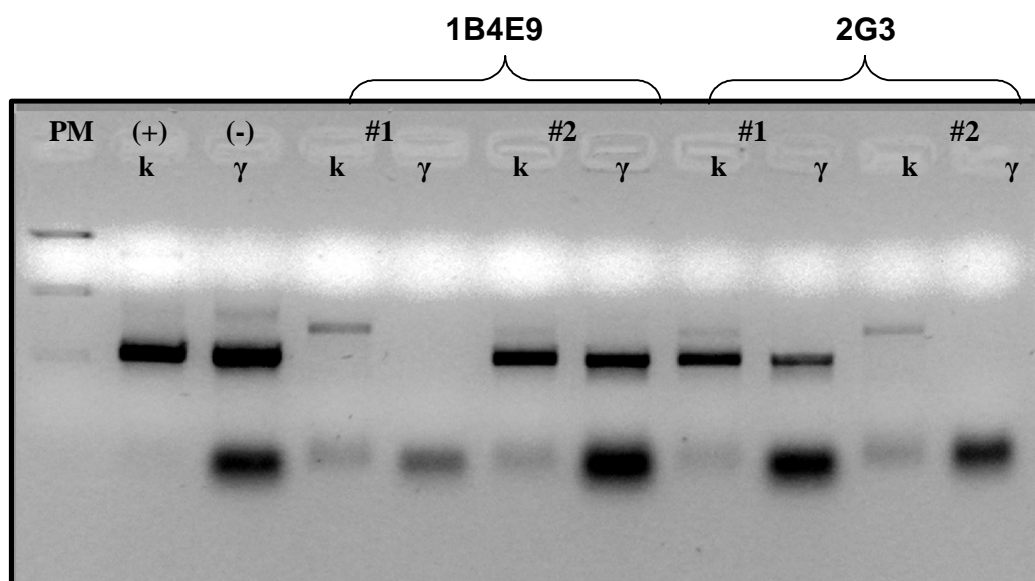
### I.3 Análisis de la funcionalidad de las cadenas clonadas de los anticuerpo 2G3 y 1B4E9 mediante su expresión en *E.coli*

Para analizar la funcionalidad de los fragmentos de los mAbs clonados se realizan subclonados en tres vectores diferentes: pComb3H, pComb3X y el pMalPSS y generan versiones Fab quiméricas y scFV del mismo, para llevar a cabo la expresión de los mAbs en *E.coli*.

#### I.3.1 Expresión de los Fab 2G3 y 1B4E9 murinos en bacterias

Inicialmente se subclonaron las secuencias nucleotídicas de los anticuerpos 2G3 y 1B4E9 en el pComb3H (Barbas I y col. 1991) para expresarlos en bacterias en la forma de Fab. Para ello, liberaron las secuencias codificantes para ambas cadenas del pCRI-TOPO empleando los sitios de restricción incorporados por los primers utilizados y estos fragmentos se introdujeron en pComb3H que permite fusionar la cadena liviana al péptido señal omp A y la pesada al pelB, de forma de que ambas cadenas sean dirigidas al espacio periplásmico. Como las cadenas gamma 2G3 y 1B4E9 clonadas no poseían el dominio CH1 completo previamente se realizó un PCR de fusión para reemplazar el fragmento que poseían CH1 por el CH1 de la cadena gamma G1 del anticuerpo murino 14D9 (Petruccelli y col. 2006). El chequeo por PCR de los plásmidos pComb3H-1B4E9 y 2G3 obtenidos, se muestra en la Figura I.12, donde se verifica que las secuencias codificantes para las cadenas livianas y pesadas poseen un tamaño aproximadamente 600 y 550bps, como es lo esperado para la cadena liviana completa (kappa) y los dominios VH-CH1 de la cadena pesada (gamma).

Los pComb3H-1B4E9 y 2G3 fueron introducidos en la cepa de *E.coli* DH10 para evitar la fusión de la cadena pesada al gen III del fago lambda (cepa no supresora del tRNA para el codon *ambar*) y se probaron distintas condiciones de inducción tales como cantidad de IPTG, concentración de glucosa (empleada para reprimir el operón lac en la etapa inicial de crecimiento de las bacterias), temperatura de inducción, entre otras. La presencia de las versiones Fabs se evaluó empleando un suero policlonal específico de Fab murinos (Sigma Anti-Mouse IgG Fab specific-Peroxidase). El análisis de los sobrenadantes de cultivo, y de las bacterias lisadas por ELISA no mostró diferencias significativas con los controles realizados con bacterias sin pComb3H, por lo que se concluyó que la expresión de los Fab murinos 1B4E9 y 2G3 no era estable.

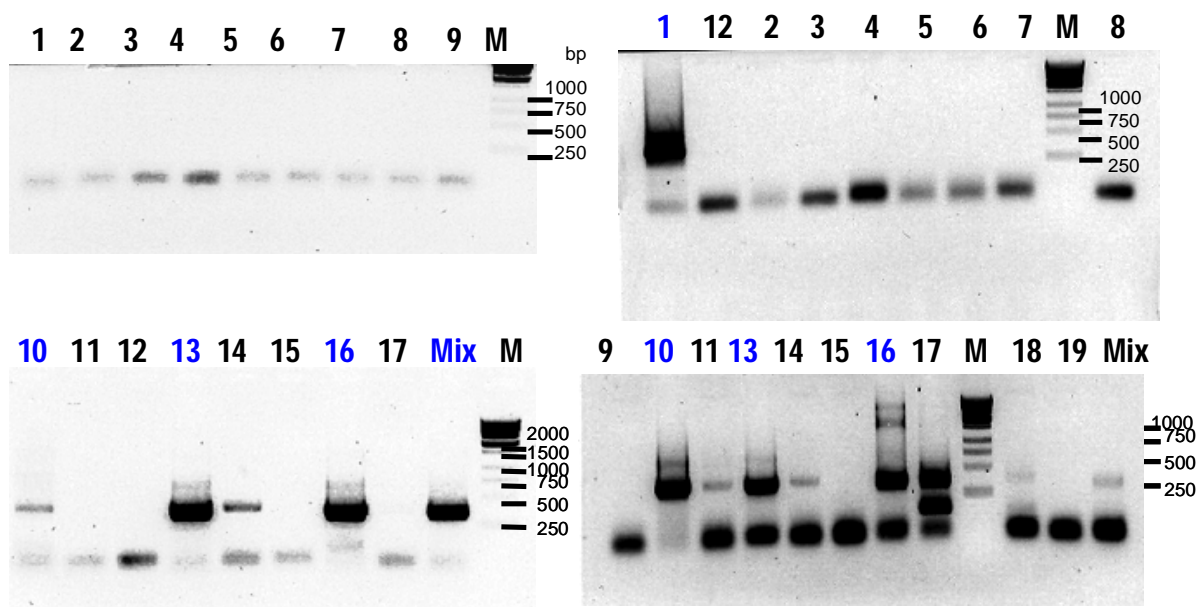


**Figura I.12:** Análisis por PCR de los clones en pComb3H con ambas cadenas ( $\gamma$  + k).  
PM: patrón de peso molecular: 3499pb, 1435pb y 600pb.

### I.3.2 Quimerización y construcción de anticuerpos simple cadena (scFv)

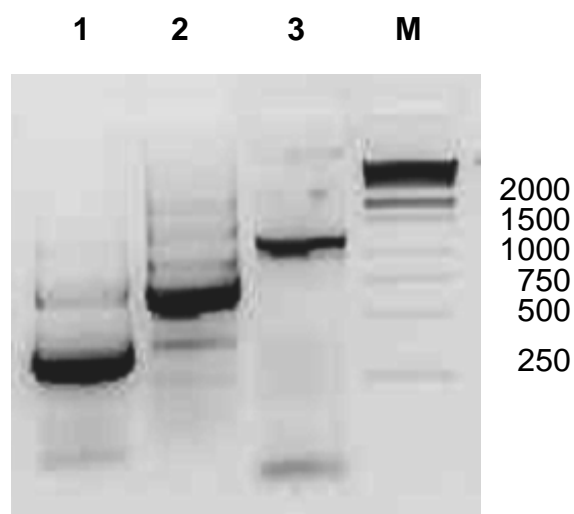
Dado que una de las estrategias más comunes para aumentar la estabilidad de anticuerpos en bacterias es fusionar los dominios variables (VH o VL) a dominios constantes que se expresan de manera estable en bacterias, se llevó a cabo la quimerización de las regiones variables de los anticuerpos 2G3 y 1B4E9. Para ello se tomaron los dominios constantes CK y CH1 de una inmunoglobulina G1 humana del vector pComb3XTT (Barbas y col. 2001) y utilizando una OE-PCR (*Overlapping Extension* PCR) se fusionaron a los VL y VH de los anticuerpos 1B4E9 y 2G3 (Métodos, sección 2.1.3.3). En la Figura I.13, se muestran los productos de la primera reacción de PCR que permitió la amplificación de las zonas variables del anticuerpo 1B4E9 con primers que permitían la fusión con los dominios constantes humanos CK y CH1. Puede apreciarse que el dominio variable de la cadena liviana (VL) pudo ser amplificada con los primers directos MSCVK10, 13, 14 y la mezcla de primers reversos MHyBJK4-B, 5 B y 12 B, mientras que el dominio variable de la cadena pesada (VH) se amplificó con los primers directos MHyVH1, 10, 16 y reversos MHyIgGCH1-B1, B2, B3 y B4. Los productos VL y VH obtenidos de esta manera fueron utilizados como molde junto con las cadenas CK y CH1 respectivamente, en otro PCR con primers en los extremos 5' de las regiones variables y 3' de las constantes, de forma de amplificar VLratón-CKhumano y VHratón-CH1humano. Estos últimos productos fueron empleados en una tercera reacción de PCR con primers sobre VL y el CH1 generándose un fragmento de aproximadamente 1500bp que codifica para el Fab (VL-CK-peIB-VH-CH1) (Figura I.14). Este

producto de reacción fue diferido con *Sfi I* clonado de forma direccional en los vectores pComb3X y pMal-PSS. El vector pComb3X posee la secuencia OmpA para dirigir la cadena liviana al espacio periplásmico y además adiciona al extremo carboxilo terminal de la cadena pesada un tag de histidinas y el epítipo de la hemaglutinina (HA) (ver esquema Figura I.15). El vector pMal-P poseen el gen codificante para la proteína de unión a maltosa (MBP, *Maltose Binding Protein*) dirigido al espacio periplásmico y permite fusionar esta proteína al extremo N-terminal de la cadena liviana (Figura I.15). La fusión a MBP suele aumentar la estabilidad y solubilidad de proteínas recombinantes.



**Figura I.13: Amplificación del VH y VL 1B4E9 para quimerizarlo.** Los paneles de la izquierda muestran los productos de amplificación de la zona variable de la cadena liviana con los primers directos: MSCVK1-17 (indicadas del 1-17) y una mezcla equimolar (Mix), y los primers reverse MHyBJK4-B, 5 B y 12 B también mezclados en relación equimolecular. Se observa amplificación con los primers MSCVK10, 13, 16 y la mezcla de primers directos. Los paneles de la derecha muestran la amplificación la zona variable de la cadena pesada, con los primers directos: MHyVH1-19 (indicadas del 1-17) y una mezcla equimolar (Mix), y una mezcla de los reverso MHyIgGCH1-B1, B2, B3 y B4. Se observa amplificación con los primers MHyVH1, 10, 16. La separación se realizó empleando un gel agarosa 2%.



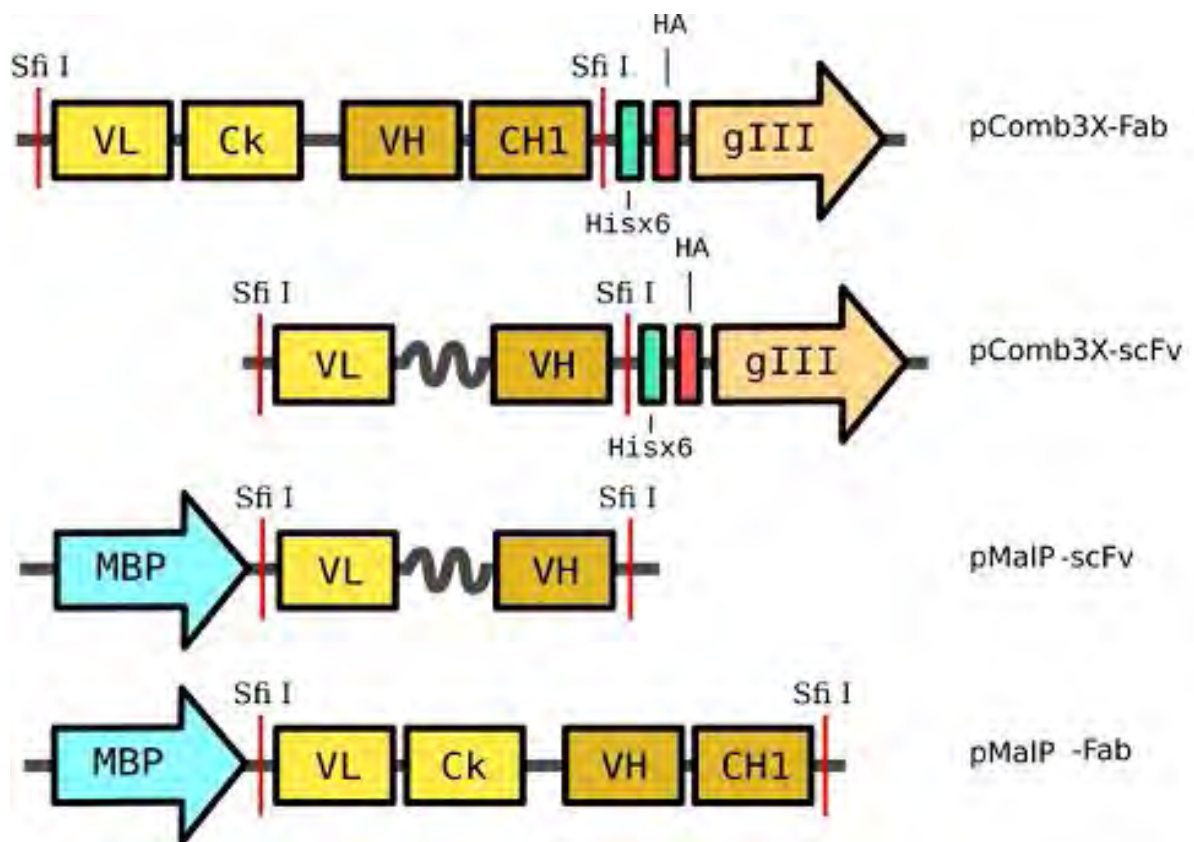


**Figura I.14: Reacciones de OE-PCR para la quimerización del Fab-1B4E9.** Se muestra las zonas variables de la cadena pesada (VH, calle 1), la cadena pesada Fd quimérica VHratón CH1humana (calle 2), la fusión VL-CK con VH-CH1 (calle 3) y patrón de peso molecular en pb (calle 4).

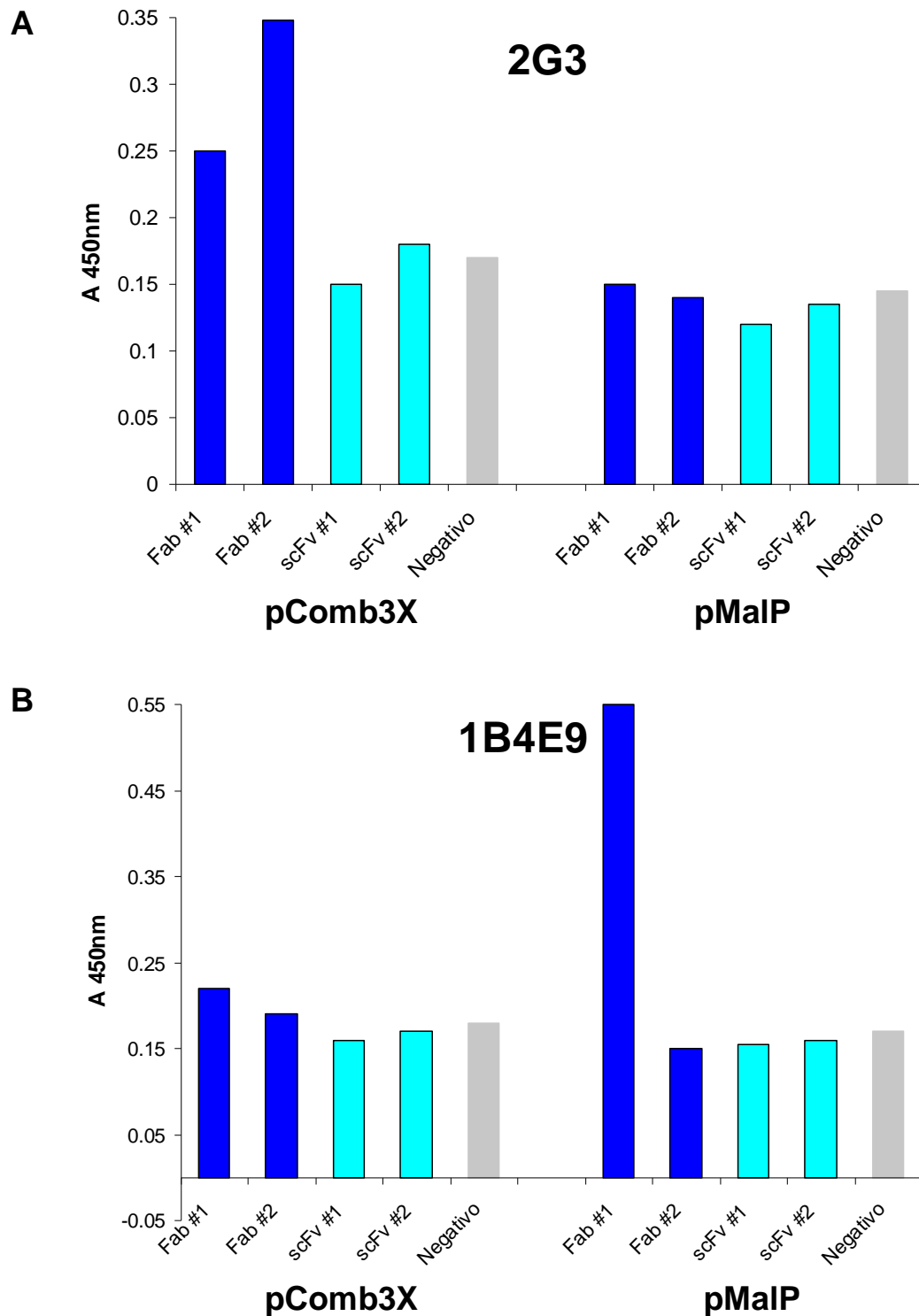
La otra estrategia utilizada para tratar de mejorar la expresión en bacterias fue la obtención de anticuerpos simple cadena (scFv) en la que los dominios VL y VH fueron clonados utilizando un linker largo de 18 aminoácidos compuesto por serinas y glicinas (SSGGGGSGGGGGSSRSS). La secuencia del linker se introdujo en los primers utilizados en la fusión de ambos dominios como se detalla en métodos, sección 2.1.3.4. Los productos de PCR de los scFv-2G3 y scFv-1B4E9 amplificados fueron digeridos con *Sfi I* y clonados también en los vectores pComb3X y pMal-PSS. La figura I.15 esquematiza las distintas construcciones disponibles de ambos anticuerpos que fueron utilizadas para expresar los anticuerpos en bacterias.

Las construcciones de los Fab y scFv de los anticuerpos 1B4E9 y 2G3 en pComb3X y pMalP fueron introducidas en DH10 y se analizó la expresión empleando distintos medios y condiciones de inducción. En este análisis se utilizaron varias colonias de cada plásmido, pues se ha informado que como estos genes son tóxicos para bacterias y el promotor *lacZ* presenta siempre una expresión basal suelen ocurrir mutaciones que anulan la expresión (Barbas y col. 2001). La Figura I.16 muestra los resultados obtenidos en las expresiones de estas construcciones utilizando volúmenes pequeños. Puede observarse que el Fab-2G3 se expresó mejor cuando estaba en el vector pComb3X, en cambio para el Fab-1B4E9 se obtuvieron mejores resultados en el pMalP. La figura también muestra la expresión de los scFv 2G3 y 1B4E9 en los vectores pComb3X y pMalP, observándose valores iguales que los controles negativos, por lo que los scFv no se expresan con

éxito. Este ensayo permitió seleccionar las cepas pComb3X-Fab-2G3 #2 y pMalP-Fab-1B4E9 #1 para producir a mayor escala los Fab quiméricos y evaluar la funcionalidad.



**Figura I.15:** Representación esquemática de las construcciones que se emplearon para expresar los anticuerpos 2G3 y 1B4E9 simple cadena (scFv) y Fab quimérico en *E. coli*. Se destacan los sitios de restricción empleados en los clonados y los Tag (His, HA, MBP) empleados en la purificación y/o detección. Los mapas de estos plásmidos se encuentran en el Anexo.



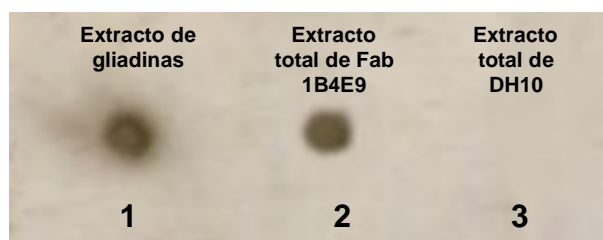
**Figura I.16:** Expresión los scFv y Fab clonados en pComb3X y pMalP. **A.** versiones del anticuerpo 2G3. **B.** versiones del anticuerpo 1B4E9.

Cultivos de *E.coli* DH 10 conteniendo las construcciones en pComb3X o pMal fueron crecidos toda la noche, posteriormente se hizo una dilución 1:200 y cuando alcanzó la DO 0.5 se indujo con IPTG por 12 hs. Las bacterias fueron cosechadas y lisadas, y la cantidad de scFv o Fab fue determinada por ELISA empleando un anticuerpo específico del Tag de histidinas para construcciones en pComb 3X o de MBP para las construcciones en pMal.

La funcionalidad de los anticuerpos fue evaluada por la capacidad de reconocer el antígeno. Para ello se realizó una inducción a mayor escala del pComb3X-Fab-2G3 y pMalPSS-Fab-1B4E9.

### I.3.3 Funcionalidad del Fab 1B4E9

Para evaluar la funcionalidad del Fab 1B4E9 quimérico se realizó una inducción del pMalP-Fab-1B4E9 #1 en DH10 a gran escala. Empleando un anticuerpo específico de MBP, se determinó que la fusión MBP-Fab se encontraba en mayor cantidad en el precipitado de bacterias y no en el medio de cultivo. Por eso para los ensayos de funcionalidad se emplearon los precipitados bacterianos luego de la inducción, previa lisis de las bacterias para liberar la fusión MBP-Fab. El extracto de bacterias inducidas para la construcción MBP-Fab fue empleado para incubar un Dot Blot en donde se sensibilizó la membrana en spots: con un extracto de prolaminas de trigo en alcohol 70%, con un extracto bacteriano conteniendo pMal-Fab quimérico 1B4E9 y un extracto de bacterias DH10 sin plásmido como control negativo. Los resultados de este ensayo se presentan en la Figura I.17. La reacción positiva del spot 1 permite verificar la capacidad que tiene el Fab-1B4E9 recombinante de reconocer el antígeno. El spot 2 permite corroborar la expresión de la fusión MBP-Fab-1B4E9 y por último, el spot 3 es un control negativo que permite evaluar el reconocimiento de proteínas endógenas de *E.coli* por parte del anticuerpo específico de MBP usado en el ensayo para evidenciar la presencia de MBP-Fab.



**Figura I.17: Dot Blot de reconocimiento del antígeno por el Fab-1B4E9.**

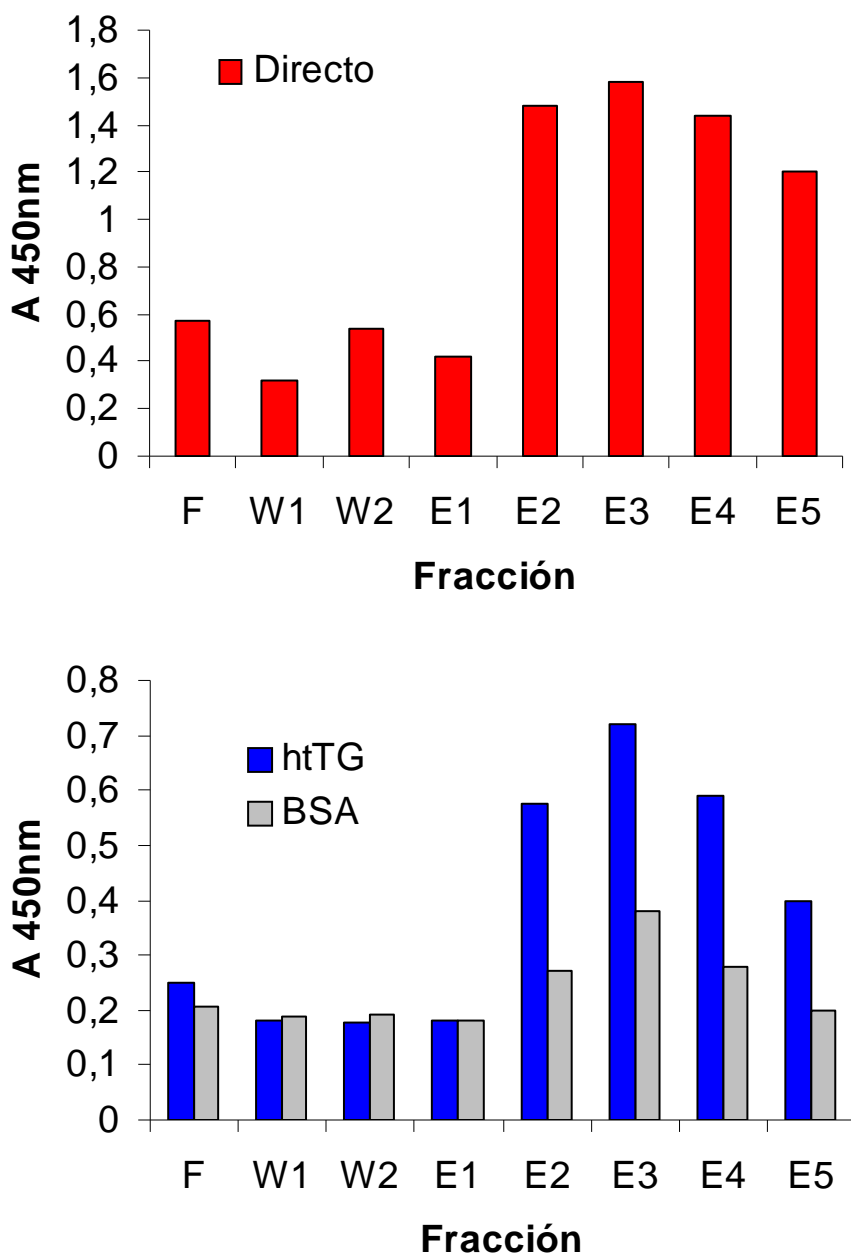
La membrana fue sembrada en el spot 1: antígeno (extracto de gliadinas); spot 2: extracto total del Fab 1B4E9 y el spot 3: extracto total de DH10. Luego se incubó la membrana con un extracto total del Fab-1B4E9 #1 en DH10 (1:10) *overnight* a 4°C y reveló con un anticuerpo anti-MBP-HRP y quimioluminiscencia.

### I.3.4 Funcionalidad del Fab 2G3

La cepa pComb3X-Fab-2G3 #2 se indujo a mayor escala, detectándose también el Fab en el precipitado bacteriano y no en el medio de cultivo. Las bacterias se lisaron y del extracto obtenido se purificó por cromatografía de afinidad del ión metal (IMAC, *immobilized metal ion affinity chromatograph*) el Fab quimérico 2G3. Las diferentes fracciones de esta purificación fueron evaluadas por ELISA evaluándose tanto la presencia de Fab (Figura I.18A) o la capacidad de unión del antígeno (Figura I.18B). Puede observarse un incremento en la cantidad de Fab en las fracciones eluidas con imidazol: E1-E5 (Figura I.18A) lo que indica que la cromatografía permitió concentrar el Fab. La parte B de la figura muestra que el Fab quimérico 2G3 reconoce el antígeno htTG recombinante utilizado en la sensibilización, con mayor afinidad que a la seroalbúmina bovina (BSA) empleada para evaluar la unión no específica. El reconocimiento de htTG superior al del control negativo indica que el Fab-2G3 clonado posee especificidad por htTG.

## I. Discusión

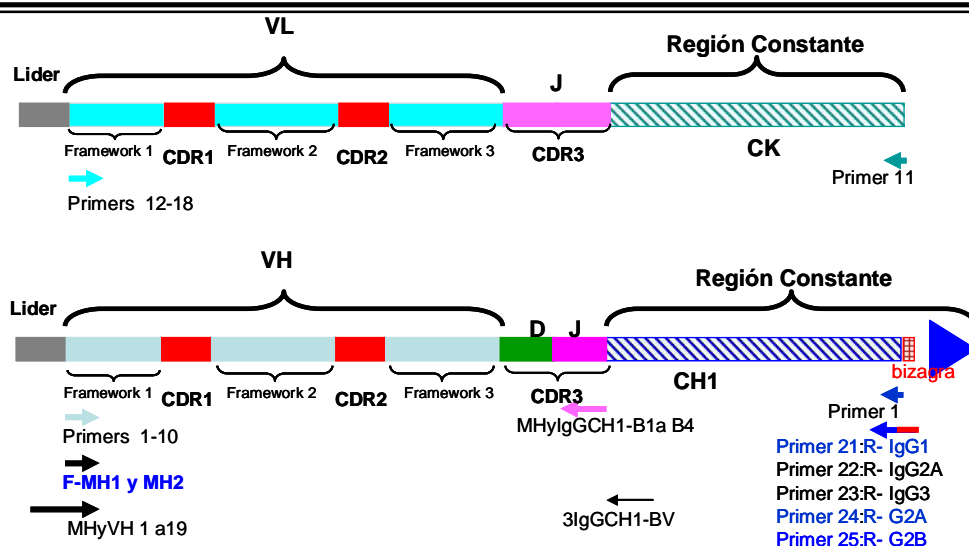
La efectividad del sistema inmune humoral depende del reconocimiento específico de antígenos por parte de inmunoglobulinas presentes en la superficie de células B. Para lograr la especificidad de reconocimiento existe un amplio arreglo de segmentos de genes germinales V (variables), D (diversidad) y J (joining) que se combinan de distintas maneras, además de hipermutaciones somáticas y edición que se producen luego del reconocimiento del antígeno, lo que hace que el número de genes funcionales de inmunoglobulinas que se puede obtener sea prácticamente ilimitado. En este trabajo se partió de hibridomas generados empleando ratones BALB/c, en el laboratorio del Dr. Fernando Chirido, 1B4E9 y 3B4H1 específicos de gliadinas (Chirido y col. 1998, Rumbo y col. 2000) y el 2G3 específico de htTG (Di Niro y col. 2005). Se realizaron preparaciones de RNA total y se obtuvieron cDNAs empleando distintas condiciones, verificándose la calidad de las preparaciones de mRNA y de cDNA por amplificación del gen de la  $\beta$ -actina. Sin embargo la amplificación de los genes codificantes para las cadenas livianas (VL-CL) y fragmento Fd (VH-CH1) de la cadena pesada fueron dificultosas por lo que hubo que modificar varias veces la estrategia planteada. La figura I.19, resume la ubicación de los distintos juegos de primers utilizados en este trabajo. Reduciendo la temperatura de apareamiento, modificando la concentración de magnesio y dNTPs y empleando el primer reverso 11 y distintas mezclas de los primers directos 12-18 se logró amplificar las cadenas livianas de los hibridomas 2G3 y 1B4E9. Para la identificación de los clones de interés fue necesario recurrir al empleo de primers internos específicos de la cadena liviana kappa ya que al modificar las condiciones de reacción de la PCR bajando su especificidad, se amplificaron fragmentos de diferente tamaño como pudo verificarse al liberar los fragmentos clonados en pCRI-TOPO (no mostrado).



**Figura I.18: Funcionalidad del Fab-2G3.** Se realizó una inducción a mayor escala de DH10-pComb3X-Fab 2G3 seguida por purificación por IMAC y análisis de las distintas fracciones por ELISA. La presencia de Fab se evaluó por ELISA directo, analizando la presencia de cadenas de anticuerpo (Panel superior). La funcionalidad del Fab se evaluó a través del reconocimiento específico del antígeno. Para ello las fosas se sensibilizaron con htTG recombinante o bien BSA (como control negativo) luego del bloqueo e incubación con las distintas fracciones de la purificación, el Fab unido se reveló empleando un anticuerpo específico de histidinas. F: fracción no unida a la columna, W1 y W2 lavados y E1-E5 elución con imidazol de los Fabs.

Luego de secuenciados los clones seleccionados, se pudo verificar que las cadenas livianas clonadas correspondían a arreglos funcionales de acuerdo a IMGT.

Inicialmente la amplificación de los Fd (VH-CH1) dió resultados negativos, coincidiendo con resultados informados por otros autores (Wang y col. 2000, Wang y col. 2006, Sabrina y col. 2010). Para tratar de superar este inconveniente, se recurrió a nuevos juegos de primers. Se ha informado que los primers utilizados habitualmente sólo amplifican el 90% de las cadenas livianas y 70% de las cadenas pesadas (Wang y col. 2000), por lo que teniendo en cuenta toda la variabilidad de los VH (350 miembros) se han propuestos primers degenerados que cubran un rango mayor (Wang y col. 2000). La ventaja de emplear primers degenerados es que con un número más reducido de primers directos se puede abarcar un mayor número de alelos VH pero la desventaja es que su empleo puede modificar la secuencia del FR1 original. A pesar de este posible inconveniente se incorporó a la estrategia el primer directo altamente degenerado F-MH2 que hibrida en la región codificante para los primeros 8 aminoácidos del FR1 del dominio VH (Wang y col. 2000). Este primer posee 7/24 nucleótidos degenerados sobre el total por lo que podrían ocasionar 6/8 cambios en la secuencia de aminoácidos en el inicio del FR1. Por otro lado se incorporaron primers reversos diseñados sobre la secuencia final de los CH1 de inmunoglobulinas gamma: R-IgG1, R-IgG2a, R-IgG3, R-G2a y R-G2b (Tabla M.1, primers 21-25) (Barbas I y col. 1991, Orum y col. 1993, Engberg y col. 1996). Algunos de estos primers son más largos extendiéndose en la zona de la bizagra (Orum y col. 1993, Engberg y col. 1996). Estos primers fueron modificados para permitir clonados posteriores en el vector pComb3H (Barbas I y col. 1991). Empleando una mezcla de primers reversos y el primer directo F-MH2 se logró amplificar las cadenas pesadas de los hibridomas 2G3, 1B4E9 y 3B4H1. Los VH 2G3, y 1B4E9 mostraron arreglos funcionales y el VH 3B4H1 presentó un arreglo particular. El análisis de las secuencias del FR1 de los VH 1B4E9, 2G3, 3B4H1 indican que hay cambios en los 3 primeros aminoácidos probablemente causada por el primer F-MH2 pero que no afectaron la funcionalidad. Aunque, otra posible desventaja del empleo de primers degenerados, es la mayor probabilidad apareamiento entrecruzando familias (Rohatgi y col. 2008), este fenómeno no fue observado en los VH clonados, como puede observarse en el alineamiento de secuencias con el alelo del directorio de dominios V de IMGT más cercano (Figuras I.7, I.8 y I.9). Es de destacar que aunque el empleo del primer F-MH2 con los nuevos primers reversos permitió amplificar los VH, la hibridación de los primers reversos no ocurrió al final de la secuencia del CH1 como se predecía, sino que lo hizo al inicio de este dominio. Las secuencias incorporadas a los fragmentos clonados son combinaciones de los distintos primers lo que sugiere que los problemas en el clonado de estos genes también se debían a diferencias en las regiones constantes de las inmunoglobulinas producidas por estos hibridomas en relación a las inmunoglobulinas típicas. Los hibridomas empleados producían inmunoglobulinas gamma que pueden ser isotipos G1, G2a, G2b, G2c y G3, que tienen varios alelos de acuerdo con la información disponible en la base de datos IMGT (ver Figura I.5 y Tabla M.1, primers 21-25), a lo que hay que sumarle la variación que



**Figura I.19:** Esquema que muestra las zonas donde hibridan los distintos oligonucleótidos utilizados para amplificar las cadenas livianas y pesadas utilizados en este trabajo. Para la cadena liviana se utilizó el primer reverso 11 que se aparea al final del CK y los primers directos 12 a 18. Para la cadena pesada se emplearon los primers directos 1-10, F-MH1 y F-MH2 y los primers reversos 1 y IgG1 (21), IgG2A (22), IgG3 (23), G2A (24), G2B (25). El primer directo VH que mejor anduvo es el F-MH2 que es altamente degenerado. Los primers reversos que permitieron amplificar las cadenas pesadas son los R-IgG1 (21), R-G2A (24) y R-G2B (25). La figura indica también las posiciones del primer interno 3IgCH1-BV, empleado para seleccionar los clones en pCR2-Topo que se secuenciaron.

puede haber entre las distintas cepas e individuos, lo que puede explicar las dificultades aún en la amplificación de las regiones constantes, ya que pequeñas diferencias entre el extremo 3' del primer y la secuencia blanco pueden abolir la amplificación.

Una de las características de los genes de inmunoglobulinas de ratón es el gran repertorio de segmentos variables regiones: 16 VH (350 miembros), 19 Vκ (164 miembros) y 3 Vλ (3 miembros), sumado al número de elementos de unión JH (4 miembros), Jκ (5 miembros) y Jλ (5), lo que ha llevado a proponer 112 primers para amplificar todos los posibles reordenamientos (Rohatgi y col. 2008). La estrategia finalmente utilizada en este trabajo, que empleó un primer directo degenerado y primers reversos sobre la región conservada de los dominios CH1 (como los utilizados en el screening de los clones conteniendo VH a ser secuenciados) seguido de PCR de fusión para construir el Fab o scFv y luego evaluar su funcionalidad, podría ser una estrategia más rápida y económica para el clonado de VH de hibridomas. Esta estrategia evitaría el empleo de un número muy grande de primers que deben evaluarse tanto de manera individual como en diferentes mezclas y que muchas veces no funcionan adecuadamente en las amplificaciones. Uno de los controles positivos que utilizamos para ajustar las condiciones de PCR fue la cadena gamma del anticuerpo 14D9 cuya amplificación muchas veces fallaba o la cantidad de producto de reacción era escaso lo que indicaba problemas de compatibilidad de los distintos juegos de primers.

Con relación a la cadena pesada gamma del hibridoma 3B4H1 clonada posee un arreglo que carece del segmento D. Este tipo de ordenamiento ha sido descrito para varios anticuerpos funcionales en los que también se observó una combinación directa de los dominios VH5 con segmentos JH2 (ver tabla I.4, zonas



D). El VH 3B4H1 posee una secuencia casi idéntica a los anticuerpos monoclonales específicos de glicanos generados por inmunización con el polisacárido galactoxilomanano presentes en la cápsula del patógeno *Cryptococcus neoformans* (ACJ05294 y HC-ACJ05303) (Casadevall y col. 1998, De Jesus y col. 2009), al VH del anticuerpos simples cadena que inhiben la replicación del HIV-1 (*human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1) que fueron generados contra la proteína reguladora Rev (AAC28091) (Duan y col. 1994). Otro ejemplo es el scFv específico de L-asparaginasa de *Escherichia coli* que le confieren a esta enzima resistencia a la proteólisis con tripsina (AAA62276) (Shami 1995). También es casi idéntico a las cadenas pesadas de anticuerpos de distintas especificidades como los que reconocen: *Mycobacterium tuberculosis* CDC 1551 (ABS20005) (Al-Sayyed y col. 2007), virus de mosaico *Cymbidium* (ACF19851) (Koohapitagtam y col. 2010), CD20 de células B humanas (AAO22134) (Hamdy y col. 2005), *Streptococcus pneumoniae* serotipo 8 (ACR56314) (Rohatgi y col. 2009), factor de transcripción 1 (AAC40156) (Bosilevac y col. 1998), toxina que causa edema (ACT6409, ACT76410, ACT764119) (Winterroth y col. 2010) y la toxina de *Bacillus anthracis* (ABF69341) (Rivera y col. 2006). Sabido es que el CDR3 posee un rol muy importante en el reconocimiento y unión al antígeno. Se ha observado que los CDR3 que reconocen antígenos solubles tienden a ser más hidrofílicos y mientras los que reconocen antígenos insolubles son más hidrofóbicos. En este último caso se ha observado durante el proceso de maduración de la afinidad ocurre una disminución de la longitud del CDR3 de la cadena pesada (Rohatgi y col. 2009), y en los casos mencionados anteriormente esta reducción es tan drástica que se pierde el segmento D. Los anticuerpos funcionales mencionados anteriormente poseen VHs prácticamente idénticos y el segmento J es hidrofóbico (Figura I.11). Las gliadinas y otras prolaminas reconocidas por el anticuerpo 3B4H1 son insolubles en agua coincidentemente con las características de los antígenos reconocidos por cadenas pesadas sin segmentos D. Para explicar cómo anticuerpos como los mencionados anteriormente reconocen antígenos tan diferentes, teniendo cadenas pesadas casi idénticas, se ha propuesto que la cadena liviana sería la que le confiere especificidad por el antígeno (Song y col. 2000). Aunque inicialmente dejamos de trabajar con el anticuerpo 3B4H1 porque el análisis del mismo en la base de datos IMGT lo identificaba como no funcional, teniendo en cuenta que hay varios ejemplos de arreglos funcionales en que la secuencia D no está presente en el CDR3, en el futuro se completará el clonado de la cadena liviana de este hibridoma, porque al reconocer también prolaminas de avena completa el perfil de reconocimiento del anticuerpo 1B4E9 que reconoce las prolaminas de cebada y centeno además de las de trigo (Rumbo y col. 2000), resultando la combinación de ambos anticuerpos de utilidad en el desarrollo de métodos de certificación de alimentos libres de gluten.

De las características estructurales de las regiones variables de los anticuerpos clonados, se puede destacar la presencia de un CDR-L1 largo en el anticuerpo 2G3 que es típico de los anticuerpos que reconocen proteínas (Ewert y col. 2004). En cambio el anticuerpo 1B4E9 posee un CDR-L1 más corto como se suele encontrar en los anticuerpos que reconocen péptidos u oligómeros, lo que está de acuerdo con las

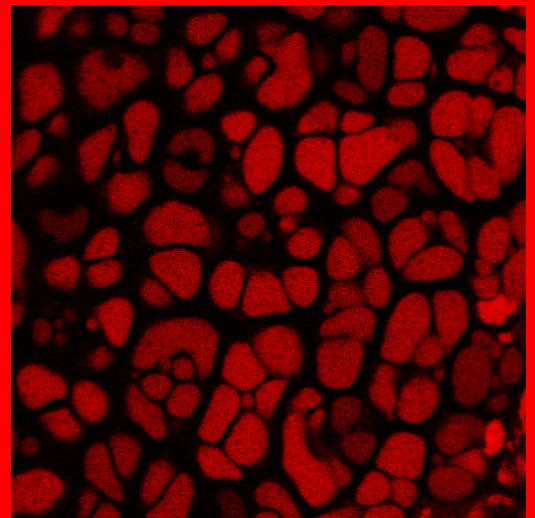
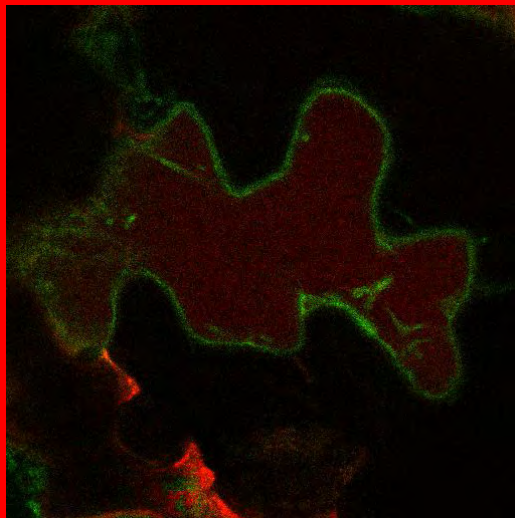
características de las gliadinas que por su alto contenido de prolina y glutamina no presentan una estructura tridimensional definida.

Los fragmentos de anticuerpos se caracterizan por diferir notablemente en sus propiedades biofísicas lo que determina que los niveles de expresión en distintos sistemas sean muy variables y dependiente de cada anticuerpo (Rathlisberger y col. 2005, Honegger y col. 2009). La estabilidad del Fab depende de los dominios variable pesados y livianos que los componen y también las uniones disulfuro intradominio que conectan las hojas betas de los FR de las cadenas livianas y pesadas (Langedijk y col. 1998, Ewert y col. 2003, 2004, Honegger y col. 2009, Kügler y col. 2009). Además de los problemas en el plegado propio de los distintos alelos que forman parte del repertorio de dominios variables y su estabilidad, hay que considerar que los fragmentos de anticuerpo y la proteína III del fago lambda (gen presente en muchos de los vectores empleados para expresar fragmentos de anticuerpos) son tóxicos y muchas veces letales para las bacterias a menos que se produzcan en niveles muy bajos (Barlow y col. 1987, White y col. 1990). En este trabajo se expresaron Fab murinos, Fab quiméricos y scFv de los anticuerpos 1B4E9 y 2G3, todos dirigidos por el promotor Lac Z, dirigiendo las distintas proteínas al espacio periplásmico utilizando los péptidos señal OmpA y/o pel B para facilitar la formación de uniones disulfuro. Para minimizar los efectos tóxicos, se agregó glucosa a los medios de cultivo para reducir la expresión basal del promotor LacZ, y además se emplearon concentraciones bajas de IPTG, en estas condiciones se logró detectar las formas quiméricas de los Fab 1B4E9 y 2G3. El Fab 1B4E9 que posee el dominio murino VH9 que es uno de los dominios VH con estabilidad más pobre (Honegger y col. 2009) se logró expresar fusionado a MBP, verificándose que reconoce gliadinas, pero no se pudo avanzar en la caracterización por su alta inestabilidad. El Fab quimérico 2G3 se logró expresar fusionado a un tag de histidinas lo que permitió concentrarlo y evaluar el reconocimiento del antígeno htTG. Los scFv 1B4E9 y 2G3 no se expresaron de manera estable en ninguno de los vectores y condiciones ensayadas. La mejora en la expresión como consecuencia de la quimerización y la poca estabilidad de los scFv observada en este trabajo, coincide con resultados informados por otros autores (Barbas y col. 2001, Ewert y col. 2004, Honegger y col. 2009, Kügler y col. 2009). Es importante destacar que cuando se seleccionan anticuerpos empleando *Phage Display* no sólo se seleccionan aquellos que reconocen el antígeno de interés, sino también aquellos que logran expresarse de manera más estable en bacterias. Los anticuerpos empleados en este trabajo al provenir de hibridomas no han sufrido este proceso de selección lo que puede justificar las dificultades encontradas en su expresión en bacterias.

## **I. Perspectivas**

Teniendo en cuenta las dificultades encontradas en la expresión de los Fab 2G3 y 1B4E9 en bacterias y a fin de poder avanzar en la caracterización se planteó la necesidad de recurrir a un sistema de expresión eucariota. Como el objetivo de nuestro grupo es generar conocimientos que mejoren a las plantas como sistema de expresión, se continuó la caracterización del anticuerpo 2G3 expresándolo en plantas.

**Capítulo II:**  
**“Caracterización de dominios del receptor de  
direccionamiento vacuolar AtRMR1 como señales de  
direccionamiento vacuolar”**



## CAPITULO II:

**“CARACTERIZACION DE DOMINIOS DEL RECEPTOR DE DIRECCIONAMIENTO VACUOLAR AtRMR1  
COMO SEÑALES DE DIRECCIONAMIENTO VACUOLAR”****II. Introducción**

El objetivo en este capítulo fue evaluar la capacidad de dominios derivados del receptor de direccionamiento vacuolar AtRMR1 en redirigir una proteína reportera secretoria a compartimentos vacuolares de reserva, es decir, si se comportan como una señal de *targeting* vacuolar.

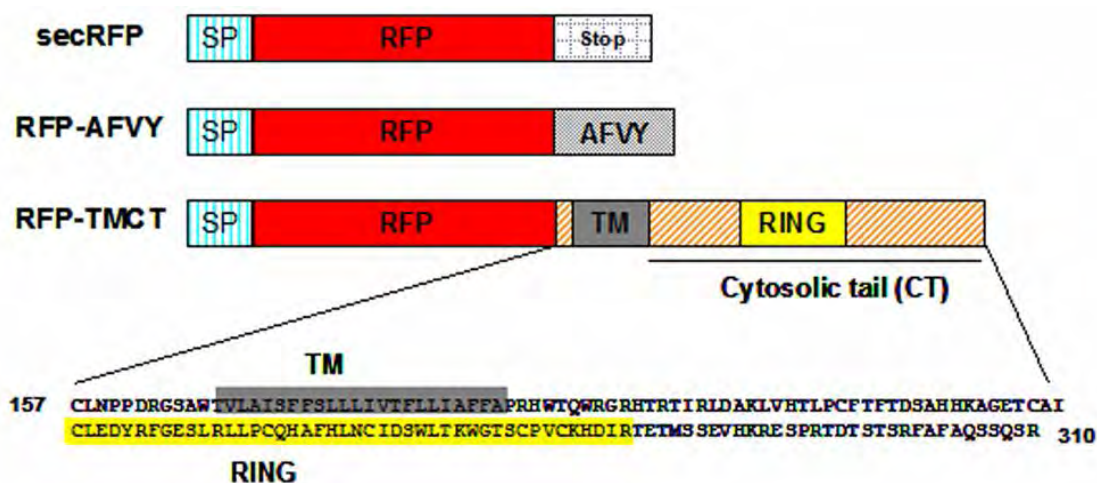
La elección de dominios del receptor putativo de direccionamiento vacuolar RMR y no VSR, para que la proteína fusionada a los mismos alcance el destino final en vacuolas de reserva, se fundamentó en varios aspectos. En principio, los receptores RMRs fueron siempre asociados al transporte de proteínas a vacuolas de reserva (Jiang y col. 2000, Jiang y col. 2001, Park y col. 2005, Park y col. 2007), en cambio los receptores VSRs, fueron inicialmente asociados al transporte a vacuolas líticas (Cao y col. 2000, Li y col. 2002). Por otro lado, la localización subcelular de los RMRs endógenos en semillas, fueron en el cristaloides de PSV de tabaco y tomate (Jiang y col. 2000) y en PSV de arábido (Hinz y col. 2007), mientras que la localización subcelular de los VSRs fueron principalmente entre el complejo de Golgi y compartimentos prevacuolares (PVC) de naturaleza lítica (Kirsch y col. 1994, Ahmed y col. 1997, Paris y col. 1997, Sanderfoot y col. 1998, Miao y col. 2006).

Los estudios de disección funcional de AtRMR, en que se evaluaban la localización final de la expresión de los dominios transmembranas y citosólicos de AtRMR, mostraban algunos resultados contradictorios. Park y col 2005, mostraban que el destino final de delecciones del AtRMR1: AtRMR1 $\Delta$ LU:HA y AtRMR1 $\Delta$ CT:HA en protoplastos de hojas de arábido era el complejo de Golgi, mientras que AtRMR1:HA se localizaba en una organela prevacuolar (vesículas DIP) (Park y col. 2005). En cambio los estudios realizados por Jiang y col. 2000 expresando una fusión de la proaleurina a los dominios TM y CT de AtRMR2 en células en suspensión de tabaco mostraban que el receptor se encontraba en el tonoplasto vacuolar de la vacuola central (Jiang y col. 2000). Por ello, para poder determinar si los dominios transmembranas y citosólicos del AtRMR1 contienen toda la información necesaria para el direccionamiento a vacuolas, era importante caracterizar estos dominios derivadas de AtRMR1 fusionado a una proteína reportera. También era necesario contar con información de ensayos de expresión estable para poder evaluar la localización en distintos órganos y tejidos ya que hay varios ejemplos de proteínas cuya localización final varía en distintos tejidos (Arcalis y col. 2004; Petrucci y col. 2006, Van Droogenbroeck y col. 2007).

II. Resultados

II.1 Obtención de las construcciones secRFP y RFP-TMCT

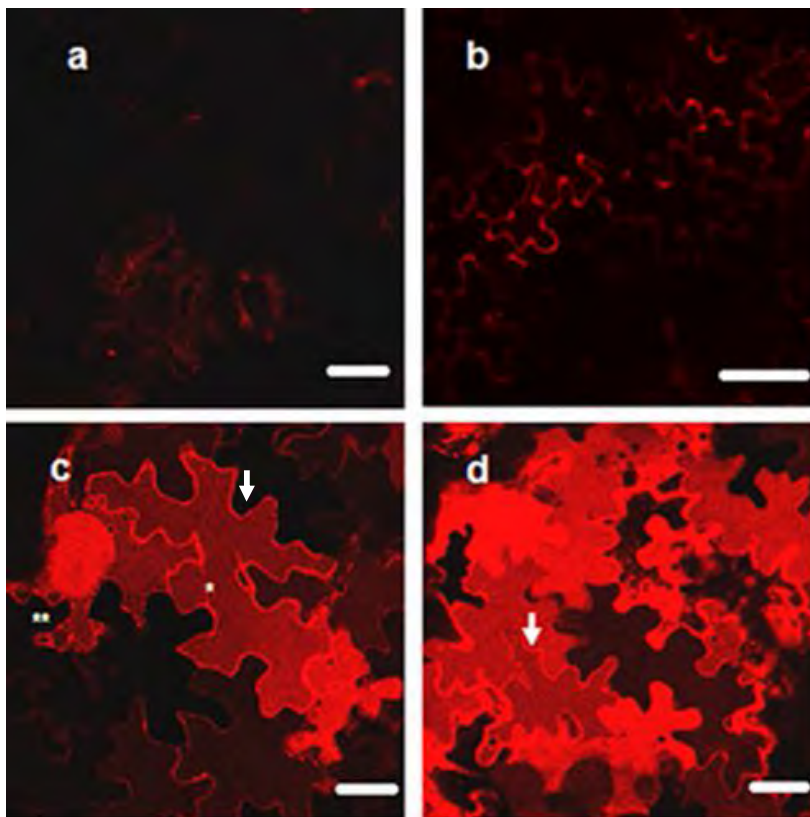
Con la finalidad de dilucidar si los dominios TM y CT de AtRMR1 son suficientes para dirigir una proteína reportera a vacuolas, se generó la fusión de estos dominios a la proteína fluorescente roja mRFP (proteína fluorescente roja monomérica). La elección de la proteína reportera mRFP se basó en su mayor estabilidad a pH bajos, característico de vacuolas (Shaner y col. 2005; Samalova y col. 2006). Para garantizar el ingreso al sistema de endomembranas en el extremo N-terminal se introdujo un péptido señal (SP), derivado de una inmunoglobulina de ratón, que funciona eficientemente en plantas (Carrington y col. 1991). Como control, se generó una versión secretoria de RFP, denominada secRFP, que consiste en la fusión de RFP al SP sin ninguna señal de *targeting*. Todas las construcciones poseían el promotor 35S del virus de mosaico del Coliflor (35S CaMV, *Cauliflower Mosaic Virus*), y la señal de terminación Nos (secuencia de terminación del gen de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*) (Figura II.1).



**Figura II.1: Representación esquemática de las construcciones reporteras utilizadas:** secRFP: versión secretoria de RFP; RFP-AFVY: RFP fusionada al ctVSS de la proteína de reserva faseolina (Hunter y col. 2007); RFP-TMCT: RFP fusionada al dominio transmembrana (TM) y cola citosólica (CT) de AtRMR1. Se detalla la secuencia polipeptídica del TMCT fusionada a RFP (aminoácidos 157-310 del AtRMR1, AAF32325). La predicción del dominio TM fue mediante el servidor <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM> (residuos 168-190 del AtRMR1); RING: Dominio RING se predijo con Prosite (residuos 232-274 del AtRMR1); SP: péptido señal; RFP: proteína fluorescente roja monomérica.

**II.2 Los ensayos de expresión transitoria en hojas de *N. tabacum* mostraron que la proteína reportera RFP-TMCT se localiza en lumen de la vacuola central de células epidérmicas**

Se llevaron a cabo ensayos de expresión transiente para evaluar las construcciones obtenidas mediante agroinfiltración (Sparkes y col. 2006) en células de epidermis de hojas en tabaco (*Nicotiana tabacum*). La observación fue realizada mediante microscopia confocal de escaneo láser (CLSM). La proteína reportera secRFP mostró un patrón apoplástico (fluorescencia irregular limitada al espacio intercelular), que es indicativo de secreción, y confirma que el péptido señal heterólogo utilizado es funcional y que RFP es una proteína sin otras señales de direccionamiento por lo que una vez introducida en la vía secretoria sigue el camino "default" que es la secreción (Figura II.2b). Como control positivo, se utilizó la proteína reportera vacuolar RFP-AFVY, que contiene un cVSS derivado de la faseolina de poroto (Hunter y col. 2007). Como se observa en la Figura II.2.c, RFP-AFVY se encuentra en el lumen de la vacuola central, coincidiendo con los resultados publicados por estos autores. Además, células con altos niveles de expresión de la construcción reportera RFP-AFVY muestran un patrón reticular (Fig. 2c, doble asterisco) y filamentos transvacuolares característicos del retículo endoplasmático (Fig. 2c, asterisco). Esta observación, evidencia el tráfico de RFP-AFVY a través del sistema de endomembranas para alcanzar su destino final: la vacuola.



**Figura II.2: Expresión transitoria de las construcciones reporteras en células epidérmicas de hojas en *N. tabacum*.** a. Control negativo: agroinfiltración con el medio. b. La proteína reportera secRFP: se observa un patrón apoplástico. c. la proteína reportera RFP-AFVY muestra fluorescencia en el lumen vacuolar y RE cortical (\*\*), y filamentos transvacuolares (\*). d. La proteína reportera RFP-TMCT: patrón de localización subcelular en el lumen vacuolar y RE cortical (flecha). Escala: 50  $\mu$ m

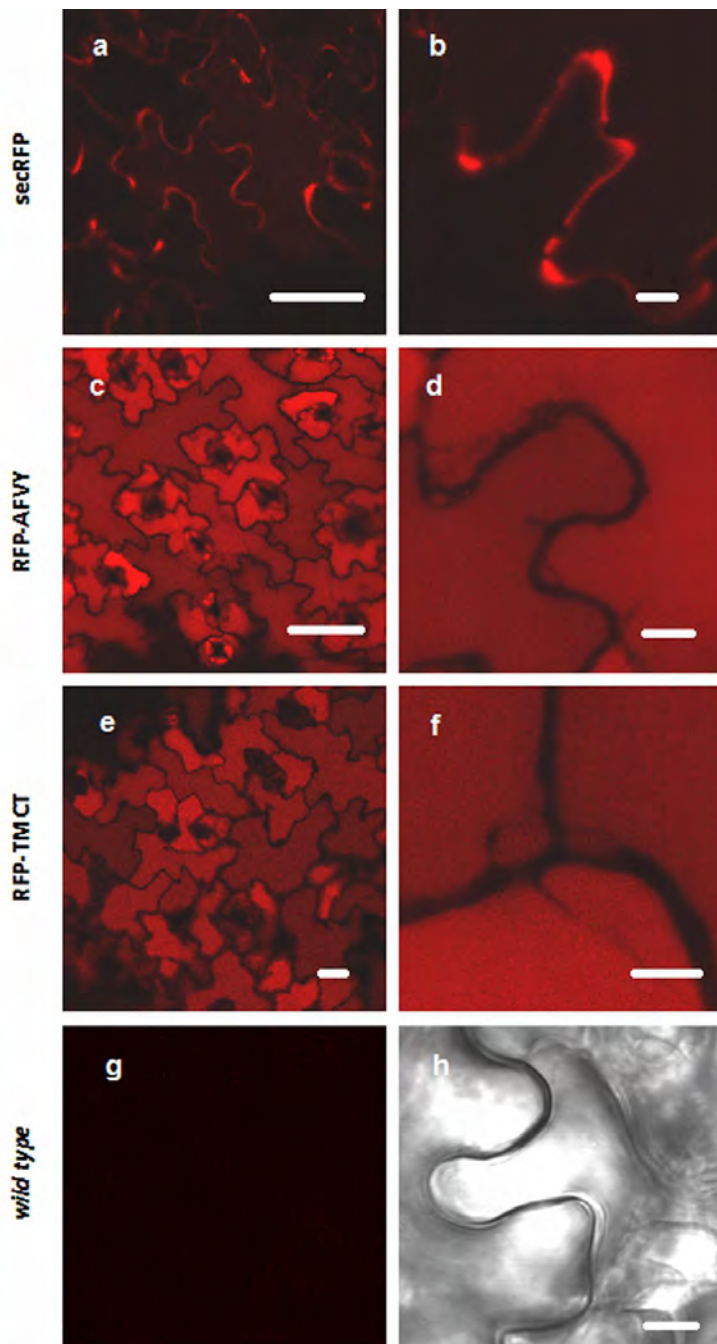
La proteína reportera RFP-TMCT mostró una localización en el lumen de la vacuola central (Figura II.2d), y a pesar de la presencia del dominio transmembrana no se observó fluorescencia en tonoplastos. En células con altos niveles de expresión, se observa fluorescencia en la periferia celular, que refleja el retículo endoplasmático cortical (Figura II.2d, flecha) como también presenta RFP-AFVY (Figura II.2c, flecha).

### **II.3 Los ensayos de expresión estable en plantas de *Arabidopsis thaliana* mostraron que la proteína reportera RFP-TMCT se localiza en la vacuola central en hojas y raíces y en PSV en semillas**

Los patrones de expresión de las construcciones reporteras de RFP generadas fueron evaluados en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* mediante CLSM. Con este fin, hojas de plántulas de 15 días expresando los reporteros individualmente fueron analizados (Figura II.3). La proteína reportera secRFP fue localizada en el apoplasto (Figura II.3a-b), coincidiendo con los resultados obtenidos en los ensayos de expresión transitoria. Las proteínas reporteras RFP-AFVY y RFP-TMCT se localizaron exclusivamente en el lumen de la vacuola central (Figura II.3c-e). En las observaciones de mayor aumento, ambas proteínas reporteras se detectaron principalmente en el lumen vacuolar y sin evidencia de un patrón tonoplástico u otro compartimiento del sistema de endomembranas (Figura II.3d-f). Dada la secreción de secRFP y que la localización de RFP-TMCT fue dentro del lumen vacuolar, se evidencia el rol específico de la secuencia TMCT como responsable de redireccionar RFP a la vacuola.

Las raíces de plántulas transgénicas expresando las construcciones RFP-TMCT y RFP-AFVY mostraron una fuerte señal fluorescente roja en el lumen vacuolar (Figura II.4), mientras que el control de raíces silvestres (*wild type*) no presentó autofluorescencia, utilizando las mismas condiciones (intensidad del láser y ganancia) de observación y adquisición de la imagen. Estos resultados demuestran que la señal de direccionamiento vacuolar TMCT se comporta de la misma manera en raíces como en hojas, coincidiendo con lo informado para el Ct-VSS de la faseolina empleado como control: RFP-AFVY (Hunter y col. 2007).

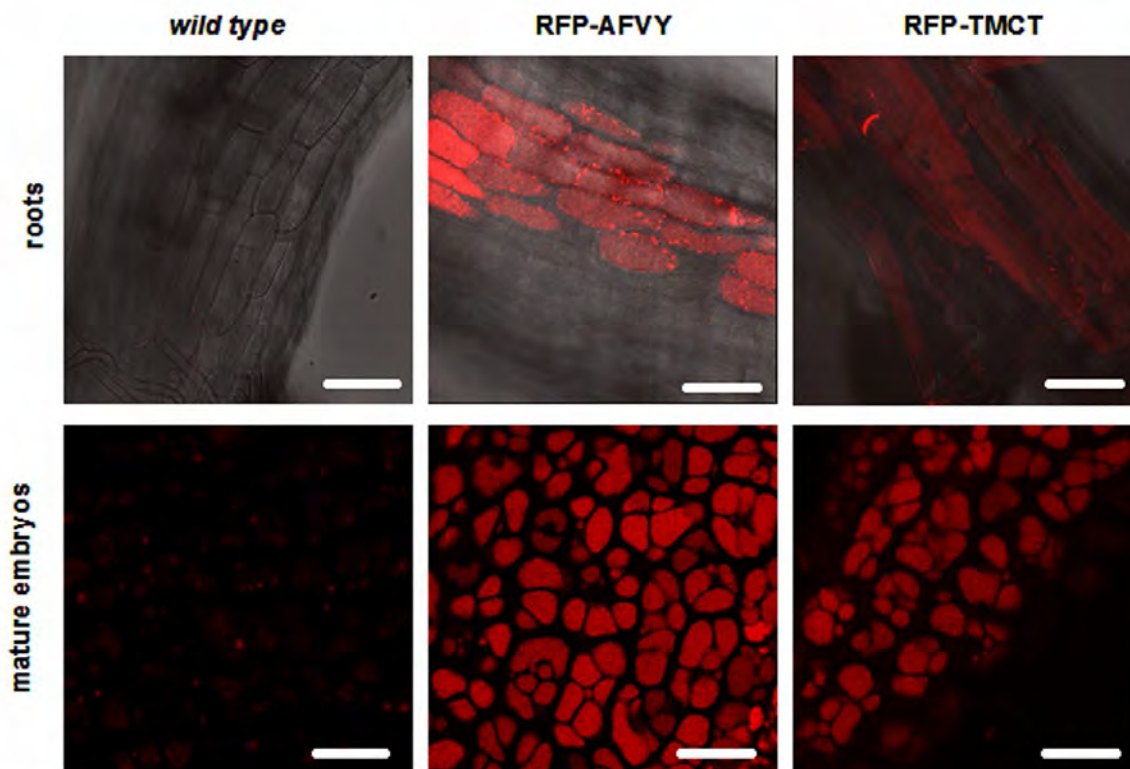
Los embriones maduros de semillas transgénicas obtenidas con las construcciones RFP-AFVY y RFP-TMCT, y de semillas no transgénicas (control negativo), fueron también analizados por CLSM (Figura II.4). Las proteínas RFP-AFVY y RFP-TMCT presentaron fluorescencia en el lumen del PSV. RFP-TMCT mostró el mismo patrón de distribución que RFP-AFVY (Hunter y col. 2007, Craddock y col. 2008), el cual difiere de las semillas no transgénicas y es claramente un patrón de PSV. Este hallazgo indica que los dominios TMCT del AtRMR1 pueden direccionar proteínas reporteras a PSV en semillas y sugiere que, en principio, estos dominios podrían ser usados para direccionar proteínas recombinantes de interés al lumen del PSV en semillas.



**Figura II.3:** Localización de RFP-TMCT en el lumen vacuolar en células epidérmicas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Plantas transgénicas desarrolladas para cada una de las construcciones fueron analizadas por microscopía confocal. Todas las imágenes fueron adquiridas usando la misma configuración. Para cada proteína reportera (indicadas a la izquierda de la micrografía) se muestran dos magnificaciones. Escala: 30  $\mu\text{m}$  (a, c, e) y 5  $\mu\text{m}$  (b, d, f, g, h).



Dado que los reporteros RFP-TMCT y RFP-AFVY tienen el mismo patrón de distribución en semillas y tejidos vegetativos en *Arabidopsis thaliana*, se concluye que los dominios transmembrana y cola citosólica de RMR son capaces de dirigir RFP al lumen vacuolar en todos los tipos de células analizadas, de manera similar a la señal soluble vacuolar ctVSS, AFVY.



**Figura II.4:** Localización de RFP-TMCT en el lumen vacuolar en raíces y embriones maduros de *Arabidopsis thaliana*. Tanto RFP-TMCT como RFP-AFVY se localizan en vacuola central en raíces y en PSV en embriones de arabidopsis. Todas las imágenes fueron adquiridas usando la misma configuración. Escala: 50  $\mu\text{m}$  en raíces y 10  $\mu\text{m}$  en embriones.

#### **II.4 La proteína reportera RFP-TMCT se asocia a membranas microsomales y se comporta como una proteína integral de membrana**

El camino seguido por proteínas integrales y periféricas de membranas en la vía secretoria y las señales que determinan su ubicación final aún no ha sido dilucidado (Barrieu y Chrispeels 1999). Con el fin de establecer si el dominio TM usado en RFP-TMCT se integra a membranas microsomales durante su síntesis, se realizaron preparaciones de microsomas de hojas de plantas transgénicas de arabisopsis obtenidas con la construcción RFP-TMCT. Los extractos totales, fracción soluble y fracciones microsomales correspondientes se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa revelándose con suero específico de RFP (Figura II.5).

El análisis del extracto total obtenido de hojas de plantas transgénicas expresando RFP-TMCT mostró una banda de masa molecular 38 kDa (Figura II.5a), que posee el tamaño molecular esperado para la fusión RFP (23kDa) a TMCT (15kDa). Este resultado muestra que la proteína está intacta por lo que es estable en hojas. Como control positivo se utilizó un extracto total de hojas de plantas expresando RFP-AFVY, que mostró una banda de 27kDa que coincide con el tamaño esperado para esta fusión.

El proceso de aislamiento y fraccionamiento de microsomas a partir de hojas de plantas de arabisopsis transgénicas expresando RFP-TMCT y RFP-AFVY se realizó siguiendo el esquema mostrado en la Figura II.5. La fracción soluble (fracción 1), posee las proteínas citosólicas y el contenido vacuolar liberado en el proceso de homogenización, mostró una banda de 38 kDa (Figura II.6, calle 4) lo que indica, que RFP-TMCT alcanza este compartimento y se encuentra intacta. El precipitado microsomal, que se obtiene luego de la homogenización del tejido y posterior ultracentrifugación (fracción 2), se resuspendió en diferentes buffers para establecer si estas proteínas se encontraban en el lumen de los microsomas y/o mostraban asociación con las membranas. La resuspensión en un buffer de sacarosa isomolar se utilizó como control para asegurar que el tratamiento no altera la estructura de los microsomas. La resuspensión en el buffer sacarosa adicionado con 1M de NaCl se realizó para liberar proteínas periféricas de membrana ubicadas del lado citosólico del microsomas, mientras que la adición del buffer sacarosa con carbonato de sodio 0.1M fue para romper los microsomas y liberar las proteínas solubles. Este último tratamiento no es capaz de liberar proteínas integrales de membrana que son liberadas solamente con tratamientos con detergentes. Las fracciones microsomales homogenizadas en estos tres buffers se separaron en fracción soluble (S) e insoluble (P, precipitado) mediante una segunda centrifugación. Estas fracciones fueron analizadas por inmunoblot. Puede observarse que RFP-TMCT (38kDa) se encuentra presente en la fracción microsomal (Figura II.6B, calles 7-12) y permanece en el precipitado luego del tratamiento con los tres buffers. Dado que RFP-TMCT no es liberada por el tratamiento alcalino que libera los componentes del lumen del microsoma se puede concluir que se comporta como una proteína integral de membrana (Figura II.6B, calle 11). En cambio

para microsomas obtenidos de hojas de plantas expresando la construcción RFP-AFVY, la proteína RFP-AFVY permanece en el precipitado cuando los microsomas se tratan con el buffer sacarosa o con la solución de sacarosa con 1M de NaCl (Figura II.6B, calles 1-4) y es liberada por tratamiento con la solución de sacarosa con 0.1M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en medio alcalino (Figura II.6B, calles 5 y 6), lo que indica que se encontraba en el lumen de los microsomas y a diferencia de RFP-TMCT no está asociada con la membrana.

Por último, a partir de hojas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* expresando RFP-TMCT se prepararon protoplastos que fueron empleados para aislar vacuolas. El análisis de esta fracción por inmunoblot mostró una banda de 38 kDa que corresponde a la proteína RFP-TMCT (Figura II.6C), lo que confirma que RFP-TMCT es estable en vacuolas. Por lo tanto la presencia de RFP-TMCT en el lumen vacuolar como se observa en las fotografías obtenidas por microscopía confocal, no se debe a una separación de RFP del dominio TMCT. Dado que la proteína RFP-TMCT está intacta en la vacuola, la ausencia de fluorescencia roja en el tonoplasto vacuolar se atribuye a una internalización del dominio transmembrana.

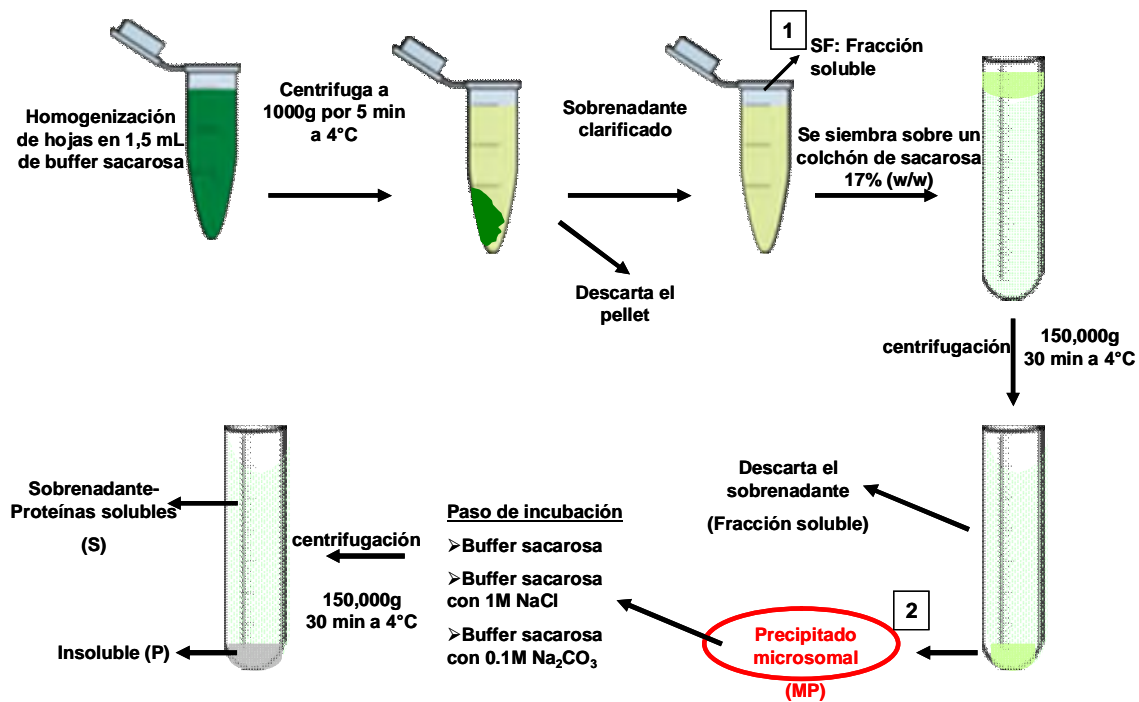
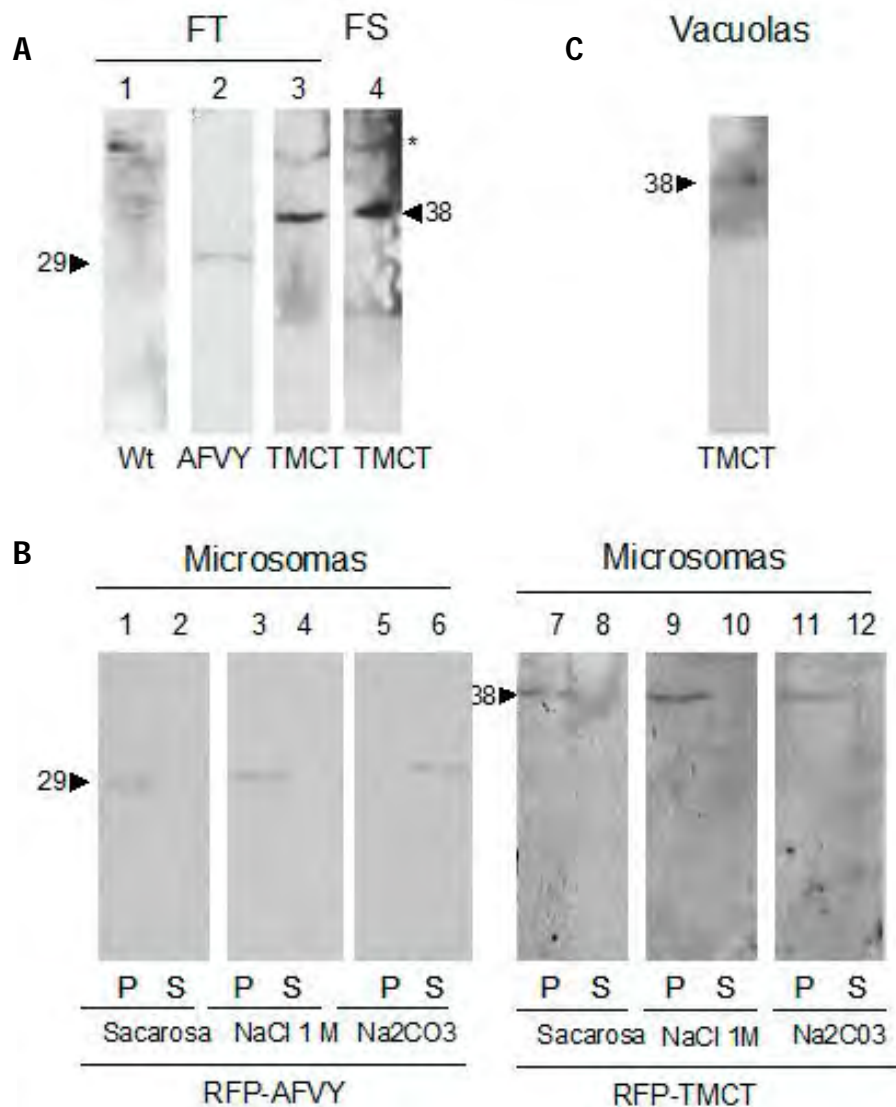


Figura II.5: Esquema del protocolo de aislamiento de microsomas



**Figura II.6: RFP-TMCT se comporta como una proteína integral de membrana.**

Immunoblot empleando un suero específico de RFP (SDS-PAGE en condiciones reductoras). **A.** Extracto de proteínas total de hojas de *A. thaliana wild type* (calle 1), de hojas con expresión estable de RFP-AFVY (calle 2) y RFP-TMCT (calle 3). SF: fracción soluble, sobrenadante de la primera preparación microsomal, que contiene proteínas citosólicas y vacuolares, obtenido a partir de hojas expresando establemente RFP-TMCT (calle 4). **B.** Precipitado microsomal obtenido a partir de hojas de *A.thaliana* transgénicas para RFP-AFVY y RFP-TMCT, incubado con Bf: buffer sacarosa, con buffer de sacarosa con 1M NaCl y buffer sacarosa con 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Luego de la incubación se separo la fracción soluble (S) de la insoluble (P, precipitado). La versión entera de RFP-TMCT se detecto en el precipitado microsomal (calles 5, 7 y 9) y no se disocia de la membrana ni con NaCl (calle 8) ni carbonato de sodio (calle 10) demostrando una asociación a la membrana como una proteína integral de membrana. La versión entera de RFP-AFVY, como se espera para una proteína soluble, es liberada por carbonato de sodio (calle 6) pero no por NaCl (calle 3). **C.** Extracción vacuolar de la muestra RFP-TMCT (calle 11). Flechas negras: versión entera de la proteína RFP-TMCT (38kDa) y RFP-AFVY (27kDa); asterisco: proteína background detectada con suero específico de RFP.

Estos resultados en conjunto con los patrones de localización subcelular evaluados para RFP-TMCT (Figura II.2, II.3 y II.4), indican que RFP-TMCT se inserta en la membrana del retículo endoplasmático pero luego sufre una internalización al lumen vacuolar. La señal TMCT es por consiguiente suficiente para direccionar una RFP secretoria a vacuolas. Además, teniendo en cuenta que se detecta la banda de 38 kDa correspondiente a la proteína RFP-TMCT completa concluimos que es estable en vacuolas y que su presencia en el lumen vacuolar no se debe a un procesamiento proteolítico sino a una internalización del dominio transmembrana.

### **II.5 RFP-TMCT colocaliza parcialmente con el marcador de ER pero no con marcadores posteriores de la vía secretoria**

Con la finalidad de dilucidar el tránsito intracelular de la señal TMCT a través de la vía secretoria, se llevaron a cabo estudios de colocalización con marcadores del sistema de endomembranas (Figura II.7 y II.8). Para ello se realizaron co-agroinfiltraciones con la construcción RFP-TMCT y un marcador específico de distintos compartimientos de la vía secretoria, y se analizaron por microscopia confocal seleccionando aquellas células de la epidermis que presentaban ambos fluoróforos.

Los ensayos de co-agroinfiltración de RFP-TMCT con el marcador de retículo endoplasmático (GFP-HDEL) (Figura II.7 a-b), mostraron un patrón reticulado en donde se destaca la envoltura nuclear y filamentos transvacuolares característico del ER. En aquellas células epidérmicas con escasa acumulación de RFP-TMCT en el lumen vacuolar, es decir en fases tempranas de expresión, por lo que RFP-TMCT se encuentra en tránsito, se evidenció la colocalización con el marcador de ER (Figura II.7a, superposición de canales). El control RFP-AFVY también mostró un patrón reticular (Fig. 2c, asteriscos), evidenciando su tránsito por el ER. Las células en fases tardías de expresión, mostraron fluorescencia roja casi exclusivamente en el lumen vacuolar y, la co-localización con marcadores del RE fue escasa, solo visible en la región de envoltura nuclear (Figura II.7b, superposición de canales).

En los ensayos de co-localización con el marcador del trans-Golgi, sialil transferasa fusionada a YFP (ST-YFP), no se detectó una co-localización evidente con RFP-TMCT (Figura II.7c), lo que sugiere que RFP-TMCT no alcanza el trans-Golgi. Sin embargo, no se puede descartar con este único ensayo su tránsito por el trans-Golgi, sumado a la complejidad de evaluar en este compartimiento sumamente dinámico un patrón de colocalización por CLSM.

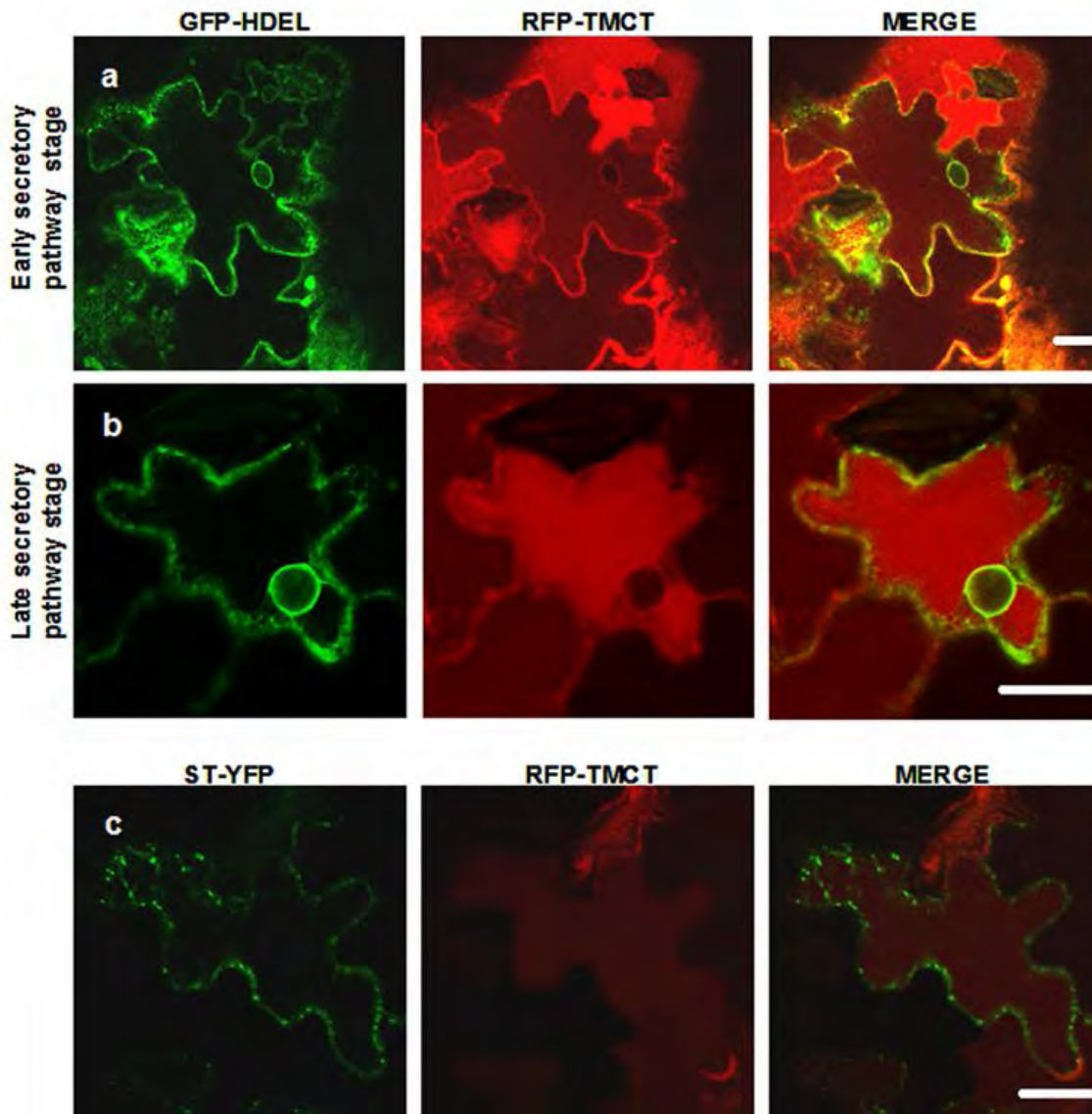
Con el fin de determinar la posible localización de RFP-TMCT en tonoplasto o membrana plasmática, dada la presencia de un dominio TM se realizaron también ensayos de co-localización con marcadores de estos compartimientos. En los ensayos de co-localización de RFP-TMCT con el marcador de tonoplasto  $\gamma$ -TIP-YFP (Hunter y col. 2007) se observaron dos patrones diferentes. Por un lado, células en una fase

temprana de expresión (marcadores aún en tránsito) mostraron una colocalización de ambos marcadores en la envoltura nuclear y filamentos transvacuolares, indicativo de ER (Figura II.8a, flecha). Los filamentos transvacuolares fueron también visualizados con la proteína RFP-AFVY (Figura II.2c, asterisco). En otro patrón que correspondía a estadio tardío no mostró una colocalización entre los reporteros RFP-TMCT y  $\gamma$ -TIP-YFP, observándose una fuerte fluorescencia roja en el lumen vacuolar que es producida por RFP-TMCT y una fluorescencia verde sobre el tonoplasto, delimitando la vacuola, generada por  $\gamma$ -TIP-YFP (Figura II.8b). Este último patrón fue el presentado por la mayor parte de las células coinfiltradas con ambos marcadores.

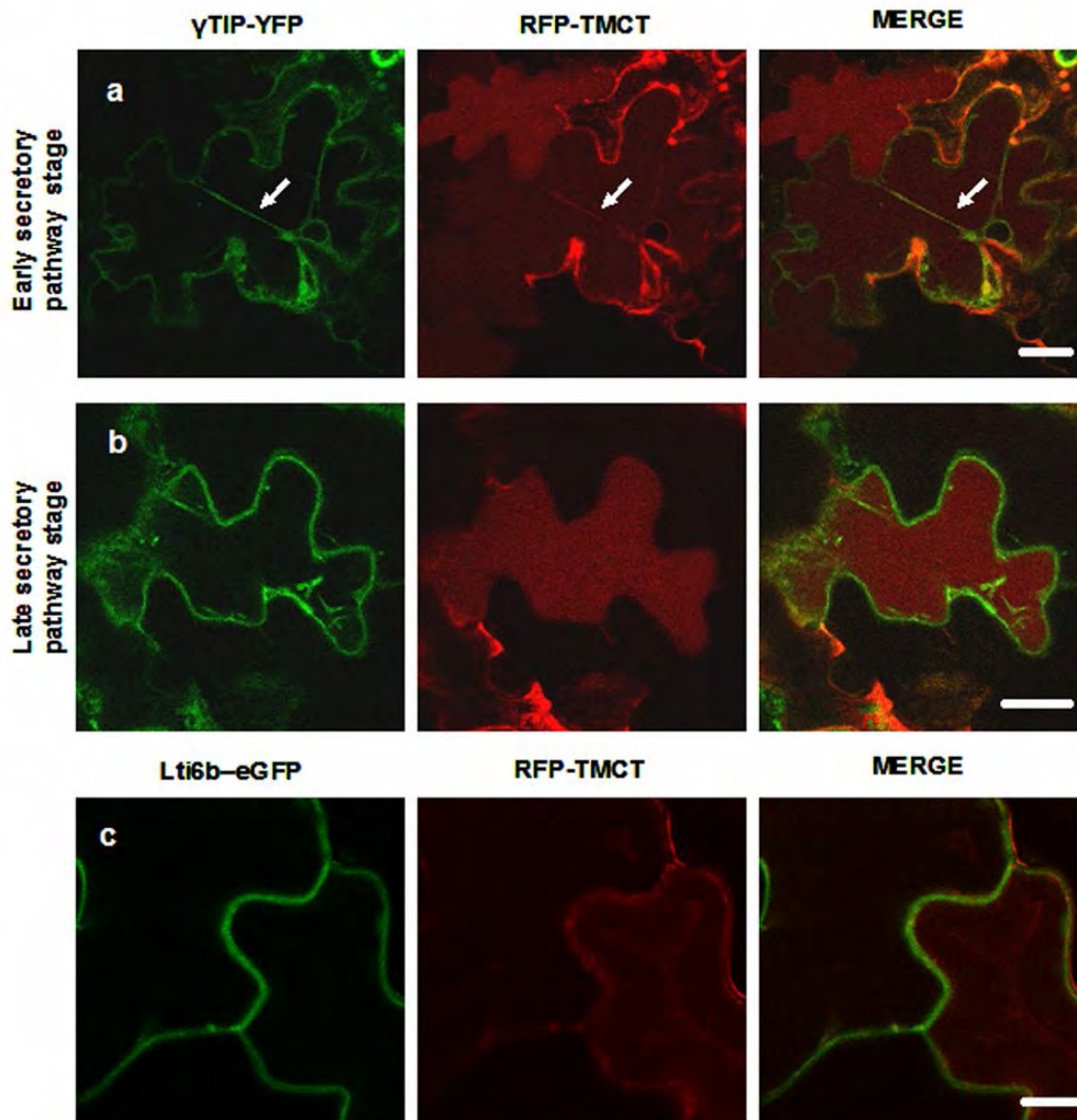
Finalmente, se realizaron co-agroinfiltraciones con RFP-TMCT y el marcador de membrana plasmática Lti6b-eGFP. En el canal verde se puede apreciar el típico patrón de membrana plasmática (Figura II.8c, marcador de membrana plasmática-GFP). Células adyacentes expresando RFP-TMCT muestran una fluorescencia roja en el lumen vacuolar (Figura II.8c, canal rojo) pero no se detecta colocalización entre estos dos marcadores (Figura II.8c, superposición de canales). Este resultado claramente indica que el dominio TM de AtRMR1 no dirige RFP a la membrana plasmática.

## **II. Discusión**

Empleando ensayos de expresión transiente en hojas de tabaco y expresión estable en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, se demostró que la fusión de secRFP a los dominios transmembranas y cola citosólica (TMCT) de AtRMR1 son suficientes para redireccionar RFP a vacuolas. Los estudios bioquímicos mostraron que RFP-TMCT se encuentra asociado a membranas microsomales lo que indica que esta señal funcionaría de manera distinta de los VSS de proteínas carga soluble, siendo por lo tanto una señal de direccionamiento vacuolar integral de membrana. Este tipo de señales integral de membrana, ha sido descritas en las enzimas que intervienen en el procesamiento de N-glicanos en el complejo de Golgi, que poseen dominios transmembrana de tipo II y una cola citosólica con toda la información necesaria para la localización en subregiones del complejo de Golgi (Saint-Jore-Dupas y col. 2006, Schoberer y col. 2009, Schoberer y Strasser 2011). Otras señales de esta clase han sido informadas por ejemplo para la fusión de una proteína reportera al dominio transmembrana de tipo I y cola citosólica del receptor de direccionamiento vacuolar BP-80, estas señales son suficientes para redireccionar la proteína reportera a vacuolas líticas en una suspensión de células de tabaco (Jiang y Rogers 1998) y a la membrana del globoide de PSV en semillas de tabaco por una vía Golgi dependiente (Jiang y col. 2000). En cambio la fusión a los seis dominios TM de proteína alfa TIPs dirige a tonoplasto de PSV por una vía Golgi independiente (Jiang y Rogers 1999, Jiang y col. 2000). Aunque se ha propuesto que la longitud del TM podría influir en la localización subcelular (Brandizzi y col. 2002) cómo funcionan este clase de señales se conocen escasamente.



**Figura II.7: RFP-TMCT colocaliza con ER pero con el marcador de Golgi.** Co-agroinfiltraciones entre RFP-TMCT y GFP-HDEL (marcador ER). **a.** Pocas células se encuentran expresando RFP-TMCT en estadios tempranos de la vía secretoria que colocalizan con el marcador de ER, como se muestra en la superposición de imágenes. **b.** La mayoría de las células, se encuentran expresando RFP-TMCT en su destino final el lumen vacuolar, sin una evidencia clara de colocalización con el marcador de RE. **c.** La co-agroinfiltración de RFP-TMCT con ST-YFP (marcador del trans-golgi) no se detecto un patrón de colocalización. Escala: 25  $\mu$ m



**Figura II.8: RFP-TMCT no colocaliza con los marcadores de tonoplasto ni membrana plasmática.** Estudios de colocalización de RFP-TMCT con el marcador de tonoplasto  $\gamma$ TIP-YFP. **a.** Células en un estadio temprano de expresión (marcadores aun en tránsito), se observan filamentos transvacuolares (flecha), pero ninguna colocalización con el marcador de tonoplasto se evidencia en la superposición de imágenes. **b.** Células en estadio tardío de expresión (marcadores en su localización final). Estudios de colocalización de RFP-TMCT con el marcador de membrana plasmática Lti6b-eGFP. **c.** No se encontró un patrón de colocalización. Escala: 25  $\mu$ m (a y b) y 10  $\mu$ m (c).



El patrón de localización de la proteína reportera RFP-TMCT en hojas, raíces y embriones transgénicos de *Arabidopsis thaliana* fue similar al observado para los marcadores vacuolares solubles RFP-AFVY y spL-RFP (Hunter y col. 2007). Por el contrario, fusiones secGFP a TMCT de AtVSRs mostraron una localización principalmente en compartimientos pre-vacuolares de células epidérmicas de tabaco (Kotzer y col. 2004; DaSilva y col. 2005) como en células BY2 transgénicas (Miao y col. 2006). Además, el patrón de localización de RFP-TMCT descrito en este trabajo es consistente con los ensayos de inmunolocalización en embriones de arábido que muestran que aunque ambos receptores AtRMR1 y AtVSR1 están presentes en compartimientos prevacuolares únicamente la proteína AtRMR alcanza la vacuola de almacenamiento proteico (Hinz y col. 2007; Wang y col. 2011). Los resultados mostrados en este capítulo apoyan las diferencias descritas para la familia de proteínas RMR versus las proteínas VSR.

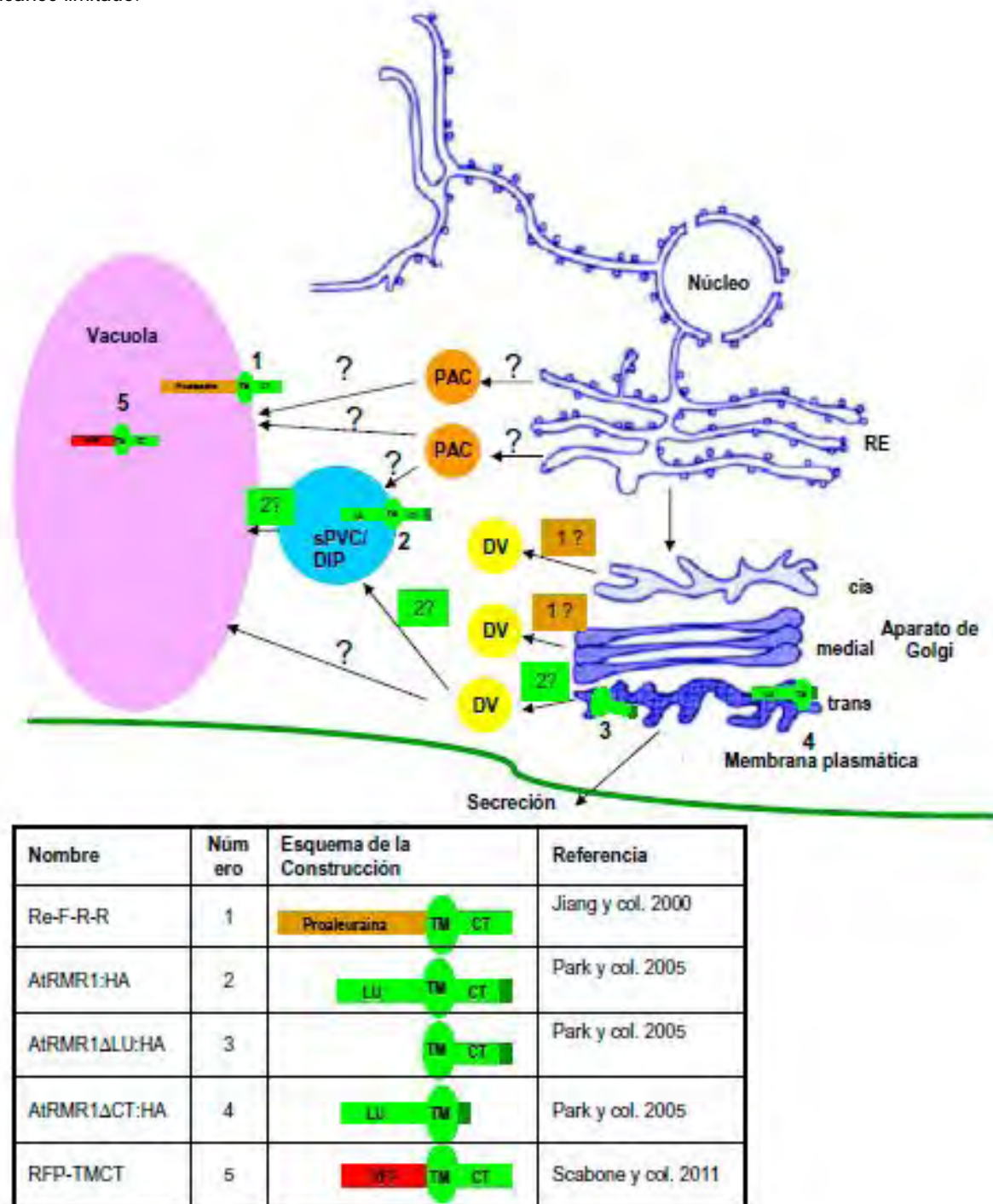
**Tabla II.1: Disección funcional del receptor At-RMR**

Construcción	Localización	Tejido	Sistema de expresión	Autor
<b>Re-F-R-R</b>	Tonoplasto vacuolar	células de mesófilo	BY2	(Jiang y col. 2000)
<b>AtRMR1:HA</b>	Organelas positiva-DIP	células de mesófilo	protoplastos de hojas de <i>A. thaliana</i>	(Park y col. 2005)
<b>AtRMR1<math>\Delta</math>LU:HA</b>	trans-Golgi	células de mesófilo	protoplastos de hojas de <i>A. thaliana</i>	
<b>AtRMR1<math>\Delta</math>CT:HA</b>	trans-Golgi	células de mesófilo	protoplastos de hojas de <i>A. thaliana</i>	
<b>RFP-TMCT</b>	Lumen de la vacuola central  Lumen de PSV	células epidérmicas  células cortex  células de mesófilo  embrión maduro	transiente en hojas de <i>N. tabacum</i> estable en hojas de <i>A. thaliana</i> estable en raíces de <i>A. thaliana</i> estable en semillas <i>A. thaliana</i>	(Scabone y col. 2011)

Como se mencionó en la introducción los receptores RMR fueron identificados buscando en el genoma de arábido proteínas con dominios transmembrana que tuvieran dominios luminales similares a los AtVSR (Jiang y col. 2000). Los primeros estudios de localización realizados mostraban que estas proteínas en semillas maduras de tabaco y tomate se encontraban en el cristaloides de PSV, mientras que en semillas inmaduras aparecían PVC de reserva o organela DIP que se desprende del ER (Jiang y col. 2000). Posteriormente se mostró que en semilla de arábido maduras se encuentran en PSV, mientras que en semillas en desarrollo aparecen en el complejo de Golgi y en vesículas densas (DV) (Hinz y col. 2007). Coincidiendo con estos últimos resultados la proteína OsRMR1 de arroz se encontró en el aparato de Golgi

trans, en compartimientos prevacuolares de reserva (PVC) y en los cuerpos proteicos tipo II (PBII). Con el fin de entender el funcionamiento de los receptores RMR se han realizado estudios de disección empleando distintas construcciones en diferentes especies y tejidos que se resumen en la Tabla II.1. Puede observarse que aunque los estudios de localización de las proteínas RMR endógenas se han realizado fundamentalmente en semillas en distintos estadios de desarrollo, los estudios de disección se realizaron en células indiferenciadas de tabaco (Jiang y col. 2000) y en protoplastos de hoja de arábido (Park y col. 2005). Los datos presentados en este trabajo constituyen el primer estudio de disección funcional de RMR por expresión estable en distintos órganos de arábido (Scabone y col. 2011). La Figura II.9 resume los distintos resultados de disección funcional de RMR. La primera construcción reportera empleada poseía el gen de la proaleurina (mutado para anular su señal de direccionamiento vacuolar endógena) fusionado a los dominios TM y CT de AtRMR2 y fue expresado en células indiferenciadas de tabaco. La proteína Re-F-R-R fue localizada en la membrana vacuolar y dado el perfil de glicosilación que poseía se propuso que atravesaría el complejo de Golgi cis y medio (Jiang y col. 2000) (Figura II.9, construcción 1). En cambio, los ensayos realizados expresando AtRMR1:HA en protoplastos de hoja de *Arabidopsis thaliana*, mostraron que AtRMR1:HA se localiza en un compartimiento prevacuolar que posee DIP (dark intrinsic protein) (Figura II.9, construcción 2) (Park y col. 2005). Se ha propuesto que las vesículas DIP darían origen al globoide de PSV en semillas (Jiang y col. 2000). Por otro lado, la construcción AtRMR1 $\Delta$ LU:HA (RMR mutante sin el dominio luminal) y AtRMR1 $\Delta$ CT:HA (RMR mutante sin la región citosólica) colocalizan mayoritariamente con un marcador de Golgi (trans-golgi) (Figura II.9, construcciones 3 y 4), lo que indica que el dominio luminal y cola citosólica son importantes para la localización de AtRMR1:HA en la organela DIP-positiva (Park y col. 2005). Los resultados de localización de RFP-TMCT presentados en este trabajo muestran que la señal TMCT es suficiente para dirigir a vacuolas y que ocurre una internalización de la proteína RFP-TMCT en vacuolas (Figura II.9, construcción 5). Estos resultados son diferentes de los mostrados para la Re-F-R-R que no sufre internalización y también de los obtenidos para AtRMR1:HA que aparece en compartimientos prevacuolares y no en vacuola central. Por otro lado la construcción AtRMR1 $\Delta$ LU:HA que posee el dominio TMCT, al igual que RFP-TMCT, en protoplastos de arábido se localiza en el trans Golgi, mientras que los datos de colocalización con el marcador del complejo de Golgi trans: sialil transferasa presentados en este trabajo, dieron resultados negativos. Tal vez la presencia del tag HA en el extremo carboxilo terminal de la proteína interfiere en el funcionamiento normal de este dominio del receptor. La falta de colocalización con ST-YFP concuerda con los estudios de glicosilación de Re-F-R-R realizados por Jiang y col. 2000 que muestran modificaciones en los glicanos típicas del complejo de Golgi cis y medio. Por otro lado estos resultados coinciden con la localización de AtRMR2 y cruciferina (Wang y col. 2011). Cabe destacar, que para descartar que RFP-TMCT atravesase el complejo de Golgi trans no alcanza con los estudios de colocalización negativa

con ST-YFP realizados por CLSM, ya que como el complejo de Golgi es muy dinámico, esta técnica tiene un alcance limitado.



**Figura II.9:** Disección funcional de AtRMR: resultados de la localización subcelular. La localización final de la proteína final esta representada por la ubicación del esquema de la construcción, mientras que el camino aparece con el número de la construcción

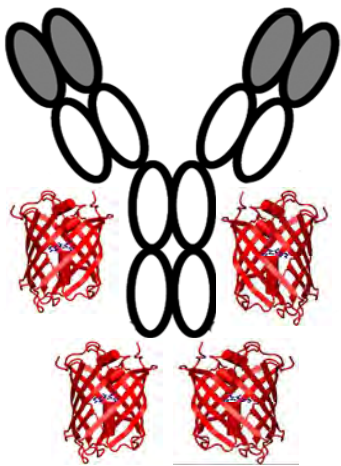
La no-localización de la proteína reportera RFP-TMCT en el tonoplasto vacuolar es consistente con otros estudios en donde AtRMR2 se localiza en la región interna de los PVCs y apoyan la hipótesis de que estas proteínas son internalizadas en PSV. Aunque todavía no se conoce si esta internalización ocurre en PSV o en compartimientos prevacuolares, el proceso de internalización podría explicar los resultados que muestran que AtRMRs, a diferencia de los VSRs, no reciclan desde compartimientos vacuolares al Golgi/ER para participar en más de una ronda de unión con proteínas carga (Wang y col. 2011). Otro aspecto a considerar, es que se ha propuesto que la interacción del receptor nativo con las proteínas de reserva carga que tienen tendencia a agregarse, serían las causantes de la internalización del receptor (Wang y col. 2011). En este trabajo se mostró que no es necesaria la interacción ligando receptor para que ocurra la internalización. Tal vez las proteínas vacuolares con señales de direccionamiento vacuolar integrales de membrana puedan también sufrir cambios de conformación en respuesta a los cambios de pH y concentración de calcio que se dan en distintos compartimientos de la vía secretoria, como han sido propuestos para la liberación de proteínas carga en vacuolas líticas y de reserva (Shimada y col. 2003; Petruccelli y col. 2007).

Teniendo en cuenta las limitaciones de los ensayos de expresión transiente en la identificación de señales de direccionamiento dada las posibilidades de sobrecargar de la maquinaria de transporte, en conjunto con las diferencias en los mecanismos de transporte de distintos órganos (Petruccelli y col. 2006; Drakakaki y col. 2006; Van Droogenbroeck y col. 2007) los resultados de expresión estable presentados muestran que TMCT pueden direccionar proteínas a vacuolas en diferentes tejidos. No se observó secreción como se ha informado para otras proteínas vacuolares expresadas en semillas (Petruccelli y col. 2006; Chiera y col. 2004; Drakakaki y col. 2006) lo que nos sugiere que tal vez esta señal dirija a PSV de semilla de manera más eficiente que otras señales. Específicamente, previamente hemos observado ese fenómeno en la expresión de un anticuerpo completo fusionado a la señal KDEL en semillas de tabaco (Petruccelli y col. 2006).

## **II. Conclusiones y Perspectivas**

Se demostró que la fusión de RFP a los dominios TM y CT de AtRMR1 es suficiente para dirigir a vacuola central en células de mesófilo de hoja y cortex de raíz y a PSV en semillas de *Arabidopsis* y a vacuola central en hojas de tabaco y que esta fusión se acumula de manera estable en hojas. En base a estos resultados se propone que la fusión de una proteína de interés a los dominios TMCT de AtRMR1 permitiría direccionarla a vacuolas superando los requerimientos de interacción entre una proteína carga y el receptor, que puede estar limitada por la baja afinidad del receptor por su proteína blanco y que es susceptible de saturación, hipótesis que se analizará en la última parte de este trabajo.

# Capítulo III: “Expresión del anticuerpo 2G3 fusionado a señales de direccionamiento vacuolar en plantas”



## CAPITULO III:

**“EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO 2G3 FUSIONADO A SEÑALES DE DIRECCIONAMIENTO VACUOLAR EN PLANTAS”****III. Introducción**

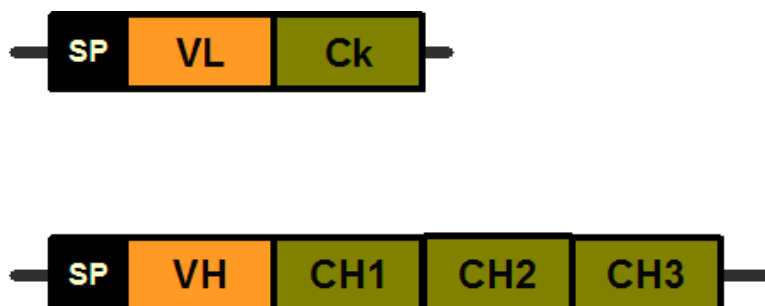
El objetivo en este capítulo fue expresar de forma temporal en hojas de *N. benthamiana* el anticuerpo específico de transglutaminasa tisular humana fusionado a distintas señales de direccionamiento vacuolar y evaluar comparativamente los niveles de acumulación obtenidos y la localización subcelular. Para llevar a cabo este análisis, las regiones variables del anticuerpo 2G3 fueron fusionadas a regiones constantes de una inmunoglobulina G1 de ratón y a distintas señales de direccionamiento. Se utilizaron las señales derivadas del receptor AtRMR1 estudiadas en este trabajo, la secuencia ctVSS de la faseolina como control vacuolar y además se generaron construcciones sin señales adicionales como control secretorio. En todos los casos, para facilitar el análisis se introdujo el gen codificante para la proteína fluorescente roja (RFP) entre los genes *IgH* e *IgL* y la señal de direccionamiento ubicada en el extremo 3'. Además, la decisión de fusionar las señales de direccionamiento vacuolar en el C-terminal de las cadenas pesadas, se basó en los mecanismos descritos de ensamblado y secreción de inmunoglobulinas en la vía secretoria (Introducción, sección 4.1), que muestran que cuando se expresa el gen *IgH* en ausencia del *IgL*, la cadena pesada queda retenida en el ER, mientras que cuando se expresa sólo el gen *IgL* la cadena liviana se secreta. Por ello, si la señal de direccionamiento esta fusionada sólo a la cadena liviana, el resultado esperado es un redireccionamiento de la misma, en cambio, si esta señal está fusionada a la cadena pesada, se verá el efecto sólo en presencia de la cadena liviana que es necesaria para el correcto plegamiento del CH1. Una vez ensamblado el anticuerpo podrá avanzar en la vía secretoria localizándose en distintos compartimientos de acuerdo con la información de direccionamiento que posea.

El empleo de un anticuerpo completo en estos estudios y no de versiones Fab o scFv, radica en la importancia actual de estas moléculas y en la necesidad de mejorar las plataformas de expresión y que al ser una glicoproteína además permitirá evaluar el camino seguido en la vía secretoria.

### III. Resultados

#### III.1 Obtención de las construcciones del anticuerpo 2G3 completo para su expresión en plantas

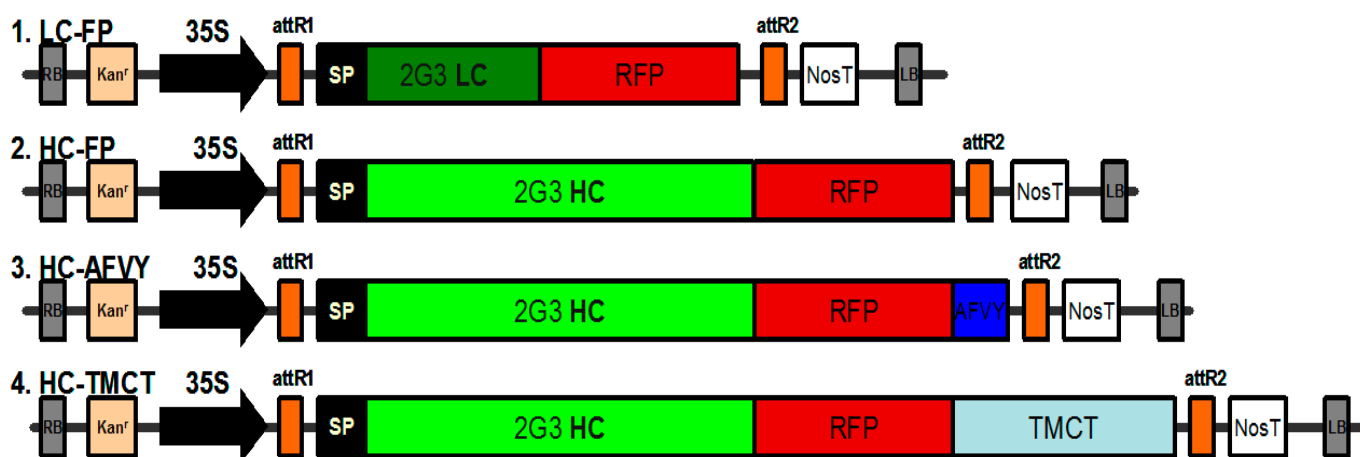
Como se mostró en el primer capítulo de este trabajo, el Fab 2G3 que logró expresarse con éxito en bacterias y que reconoce el antígeno hITG había sido quimerizado utilizando regiones constantes (CK y CH1) provenientes de una inmunoglobulina humana. Para la expresión de la inmunoglobulina completa en plantas se optó por utilizar las regiones constantes del anticuerpo catalítico 14D9 que se expresan bien en tabaco y del que disponíamos información de direccionamiento y glicosilación (Petruccelli y col 2006). Las secuencias de las regiones variables VH y VL 2G3 fueron fusionadas con las regiones constantes de los genes *IgH* e *IGL* del mAb 14D9, respectivamente, generándose de esta manera un anticuerpo murino completo. Para garantizar el ingreso al sistema de endomembranas en el extremo N-terminal se introdujo un péptido señal (SP) derivado de una inmunoglobulina de ratón que funciona eficientemente en plantas (Carrington y col. 1991).



**Figura III. 1: Esquema de las cadenas livianas y pesadas completas.** Los dominios variables del Fab 2g3 quiméricos se fusionaron a dominios constantes murinos del 14D9 para su expresión en plantas.

Los genes *IgH* e *IgL* 2G3 completos fueron fusionados a la secuencia codificante de la proteína fluorescente RFP para generar las construcciones secretorias HC-FP y LC-FP con la finalidad de evaluar mediante fluorescencia la localización subcelular. Las señales de direccionamiento vacuolares: AFVY (ctVSS de la proteína de reserva faseolina) y TMCT (dominio transmembrana y citosólico del receptor de direccionamiento vacuolar AtRMR1) fueron introducidas en el extremo 3' de la fusión HC-FP para generar las versiones vacuolares HC-FP-AFVY y HC-FP-TMCT, respectivamente (Figura III.2). Estas construcciones

fueron clonadas en el pCR8/GW/TOPO y luego por metodología Gateway en un vector de expresión de plantas pGWB2 (Nakagawa et al. 2007) que posee el promotor 35S del virus de mosaico del coliflor (35S CaMV, *Cauliflower Mosaic Virus*), y la señal de terminación de la transcripción Nos (secuencia de terminación del gen de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*), (Figura III.2).



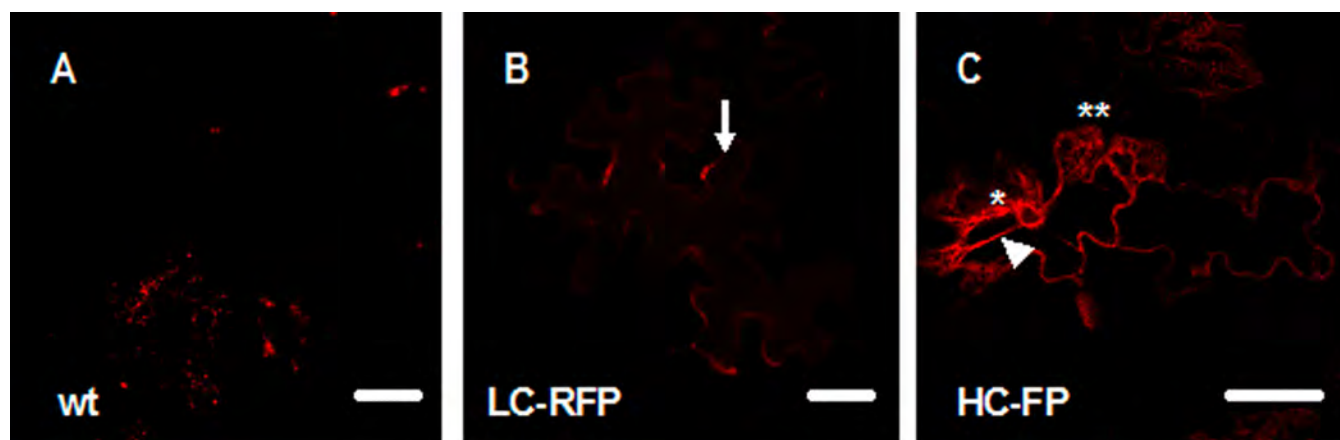
**Figura III.2: Representación esquemática de los genes *IgH* (HC) y *IgL* (LC) codificantes para el anticuerpo 2G3 fusionados a distintas señales de direccionamiento.**

LC-FP: cadenas liviana fusionada a RFP sin señal de direccionamiento; HC-RFP: cadenas pesada fusionada a RFP sin señal de direccionamiento; HC-FP-AFVY: HC-FP fusionada al ctVSS de la proteína de reserva faseolina; HC-FP-TMCT: HC-FP fusionada al dominio transmembrana (TM) y cola citosólica (CT) de AtRMR1. SP: péptido señal; RFP: proteína fluorescente roja monomérica. Kan: gen de resistencia a kanamicina, LB y RB: bordes izquierdo y derechos del T-DNA, 35S: promotor CaMV 35S, NosT: terminador de transcripción Nos. attR1: sitio de recombinación específica R1 y R2. Aclaración: la representación no respeta los tamaños de los genes y elementos regulatorios mostrados



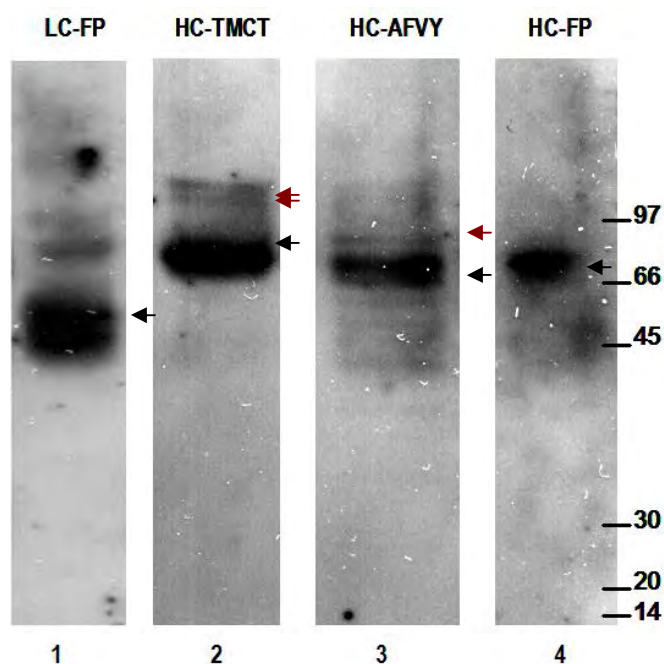
**III.2 Expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* de los genes *IgL* e *IgH* 2G3 fusionado a RFP y distintas señales de direccionamiento por separado**

Las construcciones del anticuerpo 2G3 fusionadas a las diferentes señales de direccionamiento fueron clonadas en el vector binario pGWB2 e introducidos en *A. tumefaciens* GV3101 y los mismos fueron empleados en ensayos de expresión transiente realizados en hojas de *Nicotiana benthamiana* (Sparkes y col. 2006). La epidermis de las hojas agroinfiltradas fue observada mediante microscopia confocal de escaneo láser (CLSM) 72 horas después de la agroinfiltración (Figura III.3). La construcción LC-FP mostró un patrón apoplástico (fluorescencia irregular del espacio intercelular) (Figura III.3B), que es indicativo de secreción, y confirma que el péptido señal de ratón es funcional y que la proteína LC- RFP no posee otras señales de direccionamiento, ya que una vez introducida en la vía secretoria sigue el camino "default" que es la secreción. Para la construcción HC-FP se obtuvo un patrón de localización típico de retículo endoplásmico ya que la fluorescencia aparece rodeando el núcleo, se observa un reticulado y filamentos transvacuolares (Figura III.3C). Este resultado es el esperado, ya que en ausencia de la LC el dominio CH1 de la HC no se puede plegar correctamente y permanece en el ER asociado con BiP (Feige y col. 2009). En células de epidermis de hojas *wild type* no se detectó autofluorescencia, utilizando las mismas condiciones (intensidad del láser y ganancia) de observación y adquisición de la imagen.



**Figura III.3: Agroinfiltración de las cadenas reporteras LC-FP y HC-FP por separado. A.** Control negativo: agroinfiltración con el medio. **B.** LC-FP se localizo en el espacio apoplástico (flecha). **C.** HC-FP se localizo en el retículo endoplásmico, marcando la envoltura nuclear (\*), patrón reticulado (\*\*) y filamentos transvacuolares (cabeza de flecha). Escala: 50  $\mu$ m.

De las hojas agroinfiltradas con las construcciones LC-FP, HC-FP, HC-FP-AFVY y HC-FP-TMCT por separado, se prepararon extractos totales, y las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras y transferidas a nitrocelulosa seguido de incubaciones con un suero específico de inmunoglobulinas G de ratón-biotinilado, luego con estreptavidina-HRP y revelado por quimioluminiscencia (Figura III.4). Para la construcción LC-FP se obtuvo una banda de 45kDa que está de acuerdo al tamaño esperado para la fusión LC con RFP (figura III.4, calle1) lo que indica que esta fusión es estable y que no sufre proteólisis. Como los resultados de CLSM mostraban fluorescencia roja en el apoplasto (Figura III.3B) concluimos que la fusión LC-FP no sufre degradación en ese compartimiento. Las fusiones HC-FP, HC-AFVY y HC-TMCT dieron bandas de tamaños similares de 64,6kDa, 65kDa y 80kDa esperados para las distintas fusiones (Figura III.4, calles 2, 3 y 4), lo que indica que también son estables. Los resultados de CLSM, para HC-FP mostraban localización en el ER (Figura III.3C), lo que indica que estas construcciones son estables en este compartimiento.

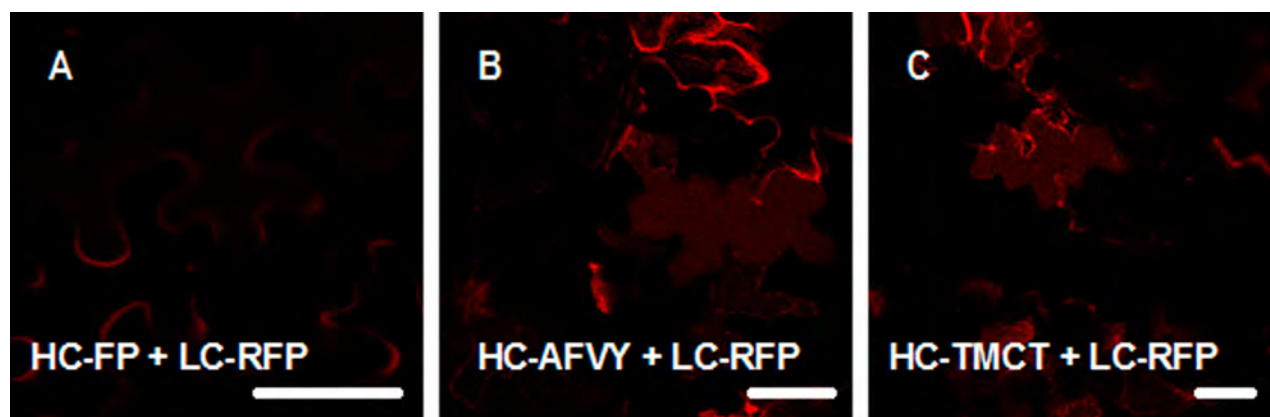


**Figura III.4:** Análisis de los extractos totales de hojas agroinfiltradas con las construcciones LC-FP, HC-FP, HC-AFVY y HC-TMCT por separado mediante inmunoblot.

La electroforesis se realizó en condiciones reductoras y el revelado se hizo empleando un suero específico de inmunoglobulinas G de ratón. LC-FP (45kDa, calle 1), HC-TMCT (80kDa, calle 2), HC-AFVY (65 kDa, calle 3) y HC-FP (64.6 kDa, calle 4).

### III.3 Expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* del anticuerpo 2G3 completo fusionado a RFP y distintas señales de direccionamiento

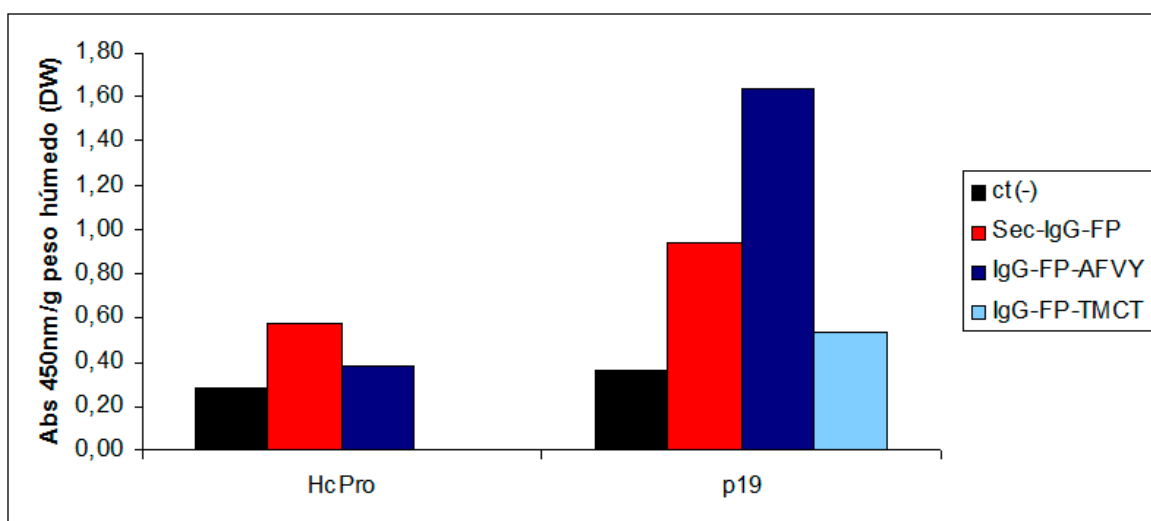
Se realizaron ensayos de co-agroinfiltración de la construcción LC-FP con las construcciones HC-FP, HC-FP-AFVY y HC-FP-TMCT en hojas de *N. benthamiana* y los resultados obtenidos fueron analizados 72hs después por CLSM (Figura III.5). La co-expresión de LC-FP y HC-FP mostró fluorescencia en el apoplasto y en la vacuola central, lo que sugiere que ocurre el ensamblado del anticuerpo ya que deja de observarse el patrón de ER que presentaba HC-FP expresado solo. Sin embargo, es necesario confirmar que la fluorescencia en el apoplasto se deba al anticuerpo 2G3 ensamblado (IgG-2G3-FP), y no de LC-FP. La co-expresión de LC-FP y HC-TMCT o con HC-AFVY presentó una fluorescencia neta en el lumen de la vacuola central en hojas (Figura III.5), este patrón de localización subcelular que es diferente del obtenido para las cadenas por separado, sugiere el ensamblado del anticuerpo y direccionamiento a la vacuola. Por ende, ambas señales TMCT y AFVY fueron suficientes para direccionar el anticuerpo a vacuolas.



**Figura III.5** Ensayos de co-expresión de las construcciones LC-FP y HC-FP fusionado a distintas señales en hojas de *N. benthamiana*. Se presentan las micrografías obtenidas por CLSM de células epidérmica. El patrón de localización de LC-FP con HC-FP-AFVY o con HC-FP-TMCT es en el lumen de la vacuola central, mientras que con HC-FP se observa un patrón de apoplasto y vacuola central. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

### III.4 Niveles de acumulación del anticuerpo 2G3-FP fusionado a distintas señales de direccionamiento en hojas de *N. benthamiana*

Las diferentes construcciones del anticuerpo 2G3 fueron co-agroinfiltradas junto con supresores de silenciamiento (HcPro o p19) y 72hs después de la agroinfiltración se prepararon extractos que fueron evaluados por ELISA directo (Figura III.6). Los mayores niveles de acumulación se obtuvieron en presencia del supresor de silenciamiento p19, en comparación con los obtenidos en presencia del supresor HcPro. La construcción del anticuerpo 2G3 que presentó mayores niveles de acumulación fue la fusionada a la señal vacuolar AFVY, siendo los mismos de 3 y 1.5 veces superiores, a los obtenidos para IgG-FP-TMCT y sec-IgG-FP. Estos resultados son aún preliminares y deben ser repetidos para poder realizar un tratamiento estadístico.



**Figura III.6:** Niveles de acumulación del anticuerpo 2G3-FP obtenidos en ensayos de expresión transiente en presencia de los supresores de silenciamiento HcPro o p19.

El histograma muestra los resultados obtenidos mediante un ELISA directo de extractos totales de hojas agroinfiltradas con LC-FP y HC-FP y/o HC-FP-AFVY y/o HC-FP-TMCT, y también HcPro o p19. Para el revelado se utilizó un suero específico de inmunoglobulina G de ratón biotinilado. Ct(-): control no agroinfiltrado, Sec-IgG-FP: co-agroinfiltración de LC-FP + HC-FP, IgG-FP-AFVY: co-agroinfiltración de LC-FP + HC-AFVY, Ig-FP-TMCT: co-agroinfiltración de LC-FP + HC-TMCT.

### III. Discusión

La expresión transitoria de las construcciones LC-FP, HC-FP, HC-FP-AFVY y HC-FP-TMCT correspondientes al anticuerpo 2G3 murino en tabaco fue exitosa y las proteínas se detectaron intactas. En el caso de LC-FP la localización subcelular fue en el apoplasto. Estos resultados son diferentes a los obtenidos cuando se expresa la cadena liviana del anticuerpo 2G12 específico del virus HIV fusionada a RFP o Venus, en que la fluorescencia es detectada en estructuras móviles puntuadas que corresponderían a compartimientos pre-vacuoles (PVCs) y también en la vacuola (Irons y col. 2008). Las diferencias de direccionamiento tal vez se deban a que el anticuerpo 2G12 es una inmunoglobulina G1 humana y no murina. La localización apoplástica de fusiones de la cadena liviana murina tipo kappa a RFP, cuando es expresada en ausencia de la cadena pesada, ha sido observada por nuestro grupo para el anticuerpo 14D9 (Gonzalez 2010). La localización de HC-FP, expresadas en ausencia de la cadena liviana, en el retículo endoplásmico es similar a la observada por otros autores (Irons y col. 2008) y está de acuerdo con el modelo de plegado de inmunoglobulinas.

La co-expresión de las construcciones LC-FP y HC-FP del anticuerpo 2G3 generadas sin señales de direccionamiento, mostró fluorescencia en el apoplasto y una fluorescencia tenue en la vacuola central. Esta localización apoplástica es el resultado esperado para una inmunoglobulina correctamente ensamblada sin otra señal de direccionamiento que seguiría la vía *default* de secreción. Sin embargo, dado que ambas cadenas del anticuerpo empleadas en el ensayo contienen el mismo fluoróforo, y que la cadena liviana fusionada a RFP por si sola alcanza el apoplasto, debería confirmarse la localización del anticuerpo completo en el apoplasto con un experimento alternativo. En este trabajo se utilizó RFP para marcar ambas cadenas de anticuerpo, pues es una proteína fluorescente que se detecta sin inconvenientes en los pH ácidos del apoplasto y vacuolas, y la detección en estos compartimientos de LC-14D9-YFP o HC-14D9-YFP ha sido negativa (Mangano y col. 2011). La fluorescencia detectada en el lumen vacuolar cuando se coexpresan LC-FP y HC-FP podría explicarse si se considera que la secreción en plantas es un proceso saturable, y el direccionamiento vacuolar ocurre como una ruta alternativa en condiciones de saturación (Vitale y Denecke 1999, Frigerio y col. 2000). Alternativamente las proteínas LC-RFP y HC-RFP mal plegadas podrían dirigirse a vacuolas para su degradación, aunque también se ha propuesto que las proteínas mal plegadas se exportarían fuera del retículo para su degradación por el proteosoma (Pedrazzini y col. 1997, Vitale y Ceriotti 2004, Vitale y Boston 2008). La co-expresión LC-FP y HC-FP-AFVY ó HC-FP-TMCT en hojas de *Nicotiana bethamiana* presentó un patrón fluorescente en el lumen vacuolar. Aunque estos son resultados preliminares, la desaparición del patrón reticulado observado para HC-FP y la relocalización de LC-FP que ya no se observa en el apoplasto sugieren un ensamblado y direccionamiento vacuolar. Este resultado es distinto del observado por Irons y col. 2008, que muestran que las fusiones 2G12-LC-FP y 2G12-HC-FP colocalizan en

grandes estructuras puntuadas que son morfológicamente diferentes de las obtenidas para 2G12-LC-FP y 2G12-HC-FP por separado. Estas estructuras parecen estar en asociación estrecha con el ER y presentan un solapamiento parcial con marcadores de PVC. En este trabajo no se informa la observación de fluorescencia en el apoplasto ni en vacuolas (Irons y col. 2008).

Los anticuerpos recombinantes son ampliamente utilizados en investigación, y en el diagnóstico de muchas enfermedades y muchas de estas aplicaciones requieren de anticuerpos fluorescentes. La conjugación a fluoróforos se realiza generalmente de manera química pero esta técnica de marcaje tiene muchas limitaciones pues puede afectar el reconocimiento del antígeno, el número de moléculas de fluorocromo incorporadas suele ser variable por lo que se genera un grupo de moléculas con distintas actividades específicas y los fluorocromos empleados habitualmente como por ejemplo fluoresceína o rodamina son mucho más sensibles al *photobleaching* que las proteínas fluorescentes (Haas y col. 2010). Por este motivo en los últimos años se han tratado de expresar directamente las inmunoglobulinas fusionadas a FP en células CHOS (Haas y col. 2010). La expresión de fusiones IgG-Citrina se realizó con éxito en células de mamífero incorporando sólo 2 moléculas de Citrina en el C terminal de la HC (Haas y col. 2010). En el trabajo presentado en este capítulo mostramos que en células vegetales un anticuerpo marcado con 4 moléculas de RFP se expresaría sin inconvenientes, lo que permitiría generar moléculas de mayor actividad específica que faciliten el diagnóstico. En particular en el caso del anticuerpo 2G3-RFP podría emplearse para estudiar la localización de hTG en muestras de biopsias de intestino de personas con enfermedad celíaca.

La expresión de fragmentos de anticuerpos marcados con proteínas fluorescentes en plantas ha sido informada sólo para el caso de un scFv contra un epítopo del virus HIV en hojas tabaco, tubérculos de papa y semillas de cebada (Schünmann y col. 2002). Este reactivo se emplearía para detectar la presencia del virus HIV en muestras de sangre humana, de una manera más barata y rápida que los métodos convencionales que emplean RT-PCR (Schünmann y col. 2002). Una de las ventajas de la expresión de una IgG-FP como la mostrada en este trabajo es que se podrían emplear los métodos de concentración y purificación ampliamente empleados para inmunoglobulinas completas. Aunque los scFv pueden ser más estables, su concentración y purificación es dependiente de cada molécula. Por otro lado, dependiendo de la aplicación debe asegurarse la no contaminación con productos de degradación y para moléculas de tamaño reducido es más complejo. Es por ello, por ejemplo, que el primer anticuerpo producido en plantas que logró una aplicación comercial es una inmunoglobulina completa empleada para purificar el antígeno de la vacuna contra la hepatitis B cubana (CIGB) (Kaiser 2008) y para esta aplicación no se emplea un scFv porque es mucho más complejo eliminar los productos de degradación que aparecen al purificar el anticuerpo de plantas.

Los resultados preliminares de los niveles de acumulación de las diferentes variantes del anticuerpo 2G3 completo: sec-IgG-FP, IgG-FP-AFVY, IgG-FP-TMCT determinados por ELISA muestran que la señal más eficiente sería el ctVSS de la faseolina AFVY. Estos resultados deben ser confirmados ya que el número

de experimentos realizados no fue suficiente para realizar un análisis estadístico. En el caso de IgG-FP-TMCT una de las cuestiones que quedó sin analizar es cómo afecta el dominio transmembrana a la solubilidad del anticuerpo, ya que los valores del ELISA surgen del análisis de proteína total soluble aplicando condiciones de separación, que tal vez no fueron las adecuadas para una proteína con un dominio transmembrana. El incremento en los niveles de acumulación por empleo de la señal AFVY ha sido informado para la proteína de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina 3 (hIGFBP-3) en semillas de tabaco que mostró un incremento de 3 veces con respecto a la versión secretoria (Cheung y col. 2009). Sin embargo no hay trabajos que muestren el efecto de la señal AFVY en la acumulación de proteínas en hojas. La única señal de direccionamiento vacuolar que ha mostrado ser efectiva al dirigir la glucocerebrosidasa (prGCD) a vacuola central de una suspensión de células no diferenciadas de zanahoria es el ctVSS de la quitinasa A de tabaco (Shaaltiel y col. 2007). La acumulación de anticuerpos completos dirigidos a vacuolas empleando VSS ha sido estudiada sólo en dos casos empleando cultivo de células no diferenciadas (Shaaltiel y col. 2006, Misaki y col. 2011). Por un lado, la expresión del anticuerpo monoclonal de ratón fusionado a la señal ssVSS de esporamina de batata mostró mayores niveles de la glicofoma vacuolar Man3FucXylGlcNAc2 con respecto a la versión sin señal VSS, en células de tabaco (BY2), pero el efecto en los niveles de acumulación no fue evaluado (Misaki y col. 2011). Por otro lado, los ensayos de expresión de inmunoglobulinas humanas G1 y G4 específicas del factor de crecimiento transformante-beta (tgFB) fusionado a la señal ctVSS (GLLVDTM) de la quitinasa A en células de zanahoria en suspensión, mostraban niveles indetectables mientras que las versiones secretorias dieron niveles detectables, por lo que esta secuencia incide de manera negativa en la acumulación de estas inmunoglobulinas humanas (Shaaltiel y col. 2006). A diferencia de estas publicaciones, en este trabajo mostramos que la secuencia CtVSS AFVY produce un incremento en la acumulación de la inmunoglobulina gamma 1 de ratón 2G3 en hojas de *N. benthamiana* con respecto a la versión secretoria.

La co-expresión de construcciones de interés junto con supresores de silenciamiento génico es actualmente una de las estrategias más comunes empleadas para incrementar los niveles de acumulación de proteínas recombinantes (Baulcombe y col. 2000, Voinnet y col. 2003). En este trabajo mostramos que el uso de HcPro y p19 incrementan los niveles de acumulación del IgG-2G3 obteniéndose los mejores resultados con el supresor p19. Estos resultados coinciden con el incremento en la acumulación de una inmunoglobulina G1 humana en tabaco en presencia del supresor p19 como ha sido informado por Circelli y col. 2010. Un efecto positivo de HcPro en la acumulación de anticuerpos fue también observado para la inmunoglobulina diagnóstica C5-1 expresada también en hojas de *N. benthamiana* (Vezina y col. 2009). Además, se ha analizado que el efecto de los distintos supresores difiere en función de los tiempos de postinfiltración (Arzola y col. 2011). Por ello, en este trabajo, además de incrementar el número de experimentos independientes, faltó evaluar el efecto de distintos tiempos postinfiltración en los niveles de acumulación del anticuerpo 2G3 ya

que se ha informado que el p19 suele tener una acción más duradera y niveles de acumulación máximos a los 14 días (Voinnet y col. 2003, Arzola y col. 2011).

### **III. Conclusiones y Perspectivas**

En este capítulo mostramos la expresión de una inmunoglobulina G1 completa en plantas fusionada a las señales de direccionamiento vacuolar derivadas del receptor AtRMR1 y de la faseolina. Los ensayos de expresión transitoria en hojas, aunque preliminares, indican que la señal de direccionamiento vacuolar ctVSS AFVY incrementa los niveles de acumulación en comparación con las versiones del anticuerpo sin señal de direccionamiento y con la señal caracterizada del receptor AtRMR1.

Las perspectivas de esta parte del trabajo son por un lado confirmar los resultados preliminares de los niveles de acumulación de seclgG-FP, IgG-FP-AFVY e IgG-FP-TMCT, estudiar el patrón de glicosilación y evaluar el reconocimiento del antígeno. Por otro lado analizar los efectos de estas señales en la acumulación en órganos de reserva en semillas.





# **Materiales y Métodos**



## **Materiales**

### **1.1 Reactivos químicos**

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

Merck (Darmstadt, Alemania).  
Sigma (St. Louis, EE.UU.).  
Fluka (Buchs, Suiza).  
Carlo Erba (Milán, Italia).  
Mallinkrodt (New York, EE.UU.).  
QIAGEN Inc. (EE.UU.)

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

Sigma (St. Louis, EE.UU.)  
Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania)  
Stratagene (La Jolla, EE.UU.)  
Promega (Madison, EE.UU.)  
New England Biolabs, NEB (Beverly, EE.UU.)  
Life technology (EE.UU.)  
PIERCE (Pierce Rockford, Illinois EEUU) Biotechnology.  
Roche  
BioAmerica Inc  
Finnzymes

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

Medio Luria-Bertani (LB): Triptona 10 g/L; Extracto de levadura 5g/L; NaCl 0,09 M; Glucosa 5,5.10-3M. Para lograr medios sólidos de cultivo se adicionó 15 g/L de agar (Merck).

Medio YEB: Triptona 10 g/L; Extracto de levadura 5g/L; Extracto de carne 5g/L; NaCl 0,09 M; Glucosa 5,5.10-3M. Para lograr medios sólidos de cultivo se adicionó 15 g/L de agar (Merck).

Medio SOC: Triptona 20 g/L; Extracto de levaduras 5 g/L; NaCl 0,6 g/L; KCl 0,2 g/L; MgCl<sub>2</sub> 0,95 g/L; MgSO<sub>4</sub> 1,2g/L; Glucosa 3,6 g/L.

Medio de Infiltración (MI): 8ml MI 5X (para 100ml: 250mM MES, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH:5,6 con NaOH), 200mg sacarosa, 4ul Acetosiringona (AS) (10,000x)+ H<sub>2</sub>O to 40mVf.

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

Para la selección de bacterias: todas las soluciones stock se prepararon en agua a una concentración 1000 veces superior (1000X) a la de trabajo. Los antibióticos tetraciclina y cloranfenicol se prepararon en etanol

70%. Las concentraciones de las soluciones stock fueron 50mg/ml para Ampicilina (Sigma Aldrich), Kanamicina (Sigma Aldrich), y Gentamicina (Sigma Aldrich), 10 mg/ml para Tetraciclina y 30mg/ml Cloranfenicol.

#### 1.4 Cepas bacterianas

##### *E.coli:*

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

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

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

**DH10**: F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL  $\Delta$ lacX74  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 araD139  $\Delta$ (ara,leu)7697 mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\lambda$ -

##### *Agrobacterium tumefaciens:*

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

#### 1.5 Vectores plasmídicos utilizados

**Vectores de clonado:** Como vector de clonado se utilizaron:

- pRTL202 (Carrington et al., 1991), el cual posee el péptido señal de la cadena pesada de una inmunoglobulina secretoria de ratón (SP).
- pENTR2M/TEV/D-TOPO (Invitrogen Argentina, SA), este vector permite el clonado direccional de productos de **PCR** con extremos romos y secuencia en el 5' CACC.
- pCR8

##### **Vector Binario:**

- pGWB2 (Nakagawa, et al. 2007) usado para transformar *agrobacterium tumefaciens*

##### **Plásmidos:**

- Vectores utilizados como moldes de DNA: La secuencia codificante de la cadena liviana del anticuerpo 14D9 fue aislada por PCR del plásmido pRTL202-35::KaKDEL (Petruccelli y col., 2006). La proteínas rojas fluorescentes.

## 1.6 Primers utilizados

### 1.6.1 Estrategia general de clonados de inmunoglobulinas

**Tabla M.1: Primers empleados en la obtención de cDNA y amplificación de inmunoglobulinas**

Primer	Nombre	Secuencia /Sitios Restricción	Posición/utilidad	Referencia
1	R-IgG1	<i>Spe I</i> AGGCTTACTAGTACAATCCCTGGGCACAAT	Final CH1 Aa Kabat 229 225 IVPRDCTSKP	(Barbas III 1991)
2	F-5'Gamma Variable	<i>XhoI</i> AGGTCCAGCTGCTCGAGTCTGG	FR1 inicio Aa Kabat 001 007	(Barbas III 1991)
3	HC-1	AGGTCCAGCTGCTCGAGTCTGG		
4	HC-2	AGGTCCAGCTGCTCGAGTCTGG		
5	HC-3	AGGTCCAGCTTCTCGAGTCTGG		
6	HC-4	AGGTCCAGCTTCTCGAGTCTGG		
7	HC-5	AGGTCCAACTGCTCGAGTCTGG		
8	HC-6	AGGTCCAACTGCTCGAGTCTGG		
9	HC-7	AGGTCCAACTTCTCGAGTCTGG		
10	HC-8	AGGTCCAACTTCTCGAGTCTGG		
11	R- 3'Kappa	<i>XbaI</i> GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCTCTGTTGA		
12	F-5'Kappa Variable	<i>SacI</i> CCAGTTCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT	FR1 inicio Aa Kabat 003 008	(Barbas III, 1991) Amplificación VL
13	LC-1	CCAGTTCGAGCTCGTGTGACGAGCCGCC		
14	LC-2	CCAGTTCGAGCTCGTGTGACGAGCCGCC		
15	LC-3	CCAGTTCGAGCTCGTGTGACGAGCCGCC		
16	LC-4	CCAGTTCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCA		
17	LC-5	CCAGATGTGAGCTCGTGTGACCCAGTCTCCA		
18	LC-6	CCAGATGTGAGCTCGTGTGACCCAGTCTCCA		
21	R- IgG1	<i>Spe I</i> AGGCTTACTAGTACAATCCCTGGGCACAATTTTCTTGCCACC	Final CH1 y secuencia Bizagra VDKKIVPRDCTSKP	Modificado de (Engberg 1996) Amplificación Fd
22	R- IgG2A	<i>Spe I</i> GTTCTGACTAGTGGGCACTCTGGGCTC	Secuencia Bizagra EPRVPI	(Barbas III 1991) Amplificación Fd
23	R- IgG3	<i>Spe I</i> GGGGGTA <del>CTAGT</del> CTTGGGTATTCTAGGCTC	Secuencia Bizagra EPRIPKPSTPPG	(Barbas III 1991) Amplificación Fd
24	R- G2A	<i>Spe I</i> GTTCTGACTAGTACAGGGCTTGATTGTGGGCCCTCTGGG	Secuencia Bizagra PRGPTIKPC	(Orum 1993) Amplificación Fd
25	R- G2B	<i>Spe I</i> GTTCTGACTAGTACAGGGGTTGATTGTTGAAATGGCCCG	Secuencia Bizagra GPISTINPC	(Orum 1993) Amplificación Fd
	F-MH1	<i>XhoI</i> CTTCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGSAGTC	Inicio FR1 Aa Kabat 001 007	Modificado de (Wang 2000) Amplificación VH
	F-MH2	<i>XhoI</i> CTTCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG	Inicio FR1 Aa Kabat 001 008	Modificado de (Wang 2000) Amplificación VH
	R-K3	CAGATGGTGCAGCCACAGTCCGTTTGTAGTTCAGCTTGG	3' primer para VL	(Bose y col. 2005) Para screening
	3IgGCH1	GCCAGTGGATAGACRGATG	Inicio CH1	Para screening
	Oligo(dT) 20	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT		Síntesis de cDNA
	PM1	CCGGATCCTCTAGAGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT		Síntesis de cDNA

	F-actina	GCTCCGGCATGTGCAA	Control cdNA	541 pb producto esperado Amplificación actina
	R-actina	AGGATCTTCATGAGGTAGT	Control cdNA	

Código de bases mezcla: R a, g; Y c, t; M a, c; K g, t; s c, g; w a, t; v a, c, g; n a, c, g, t.

Tabla M.2: Primers empleados en la quimerización de Fab

Quimerización de Fab	Amplificación
<p><b>V<sub>k</sub> 5' Sense Primers</b></p> <p>MSCVK-1 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TCC AGC TGA CTC AGC C 3' 1</p> <p>MSCVK-2 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TTC TCW CCC AGT C 3' 2</p> <p>MSCVK-3 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TGM TMA CTC AGT C 3' 5</p> <p>MSCVK-4 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TGY TRA CAC AGT C 3' 3.5</p> <p>MSCVK-5 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TRA TGA CMC AGT C 3' 4</p> <p>MSCVK-6 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTM AGA TRA MCC AGT C 3' 7</p> <p>MSCVK-7 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTC AGA TGA YDC AGT C 3' 6</p> <p>MSCVK-8 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TYC AGA TGA CAC AGA C 3' 1.5</p> <p>MSCVK-9 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TTC TCA WCC AGT C 3' 2</p> <p>MSCVK-10 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG WGC TSA CCC AAT C 3' 3.5</p> <p>MSCVK-11 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTS TRA TGA CCC ART C 3' 8</p> <p>MSCVK-12 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYR TTK TGA TGA CCC ARA C 3' 8</p> <p>MSCVK-13 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TGA TGA CBC AGK C 3' 6</p> <p>MSCVK-14 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TGA TAA CYC AGG A 3' 2</p> <p>MSCVK-15 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TGA TGA CCC AGW T 3' 2</p> <p>MSCVK-16 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTG TGA TGA CAC AAC C 3' 1</p> <p>MSCVK-17 5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG AYA TTT TGC TGA CTC AGT C 3' 1</p> <p><b>k 3' Reverse Primers</b></p> <p>MHybJK12-B 5' AGA TGG TGC AGC CAC AGT TCG TTT KAT TTC CAG YTT GGT CCC 3' 1</p> <p>MHybJK4-B 5' AGA TGG TGC AGC CAC AGT TCG TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC 3' 1</p> <p>MHybJK5-B 5' AGA TGG TGC AGC CAC AGT TCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC 3' 1</p>	VL ratón
<p><b>VH 5' Sense Primers</b></p> <p>MHyVH1 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTR MAG CTT CAG GAG TC 3' 4</p> <p>MHyVH2 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC 3' 4</p> <p>MHyVH3 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTG CAG CTG AAG SAS TC 3' 3</p> <p>MHyVH4 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC 3' 4</p> <p>MHyVH5 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTY CAG CTB CAG CAR TC 3' 7</p> <p>MHyVH6 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTY CAR CTG CAG CAG TC 3' 2</p> <p>MHyVH7 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTC CAC GTG AAG CAG TC 3' 1</p> <p>MHyVH8 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTG AAS STG GTG GAA TC 3' 2</p> <p>MHyVH9 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTG AWG YTG GTG GAG TC 3' 5</p> <p>MHyVH10 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTG CAG SKG GTG GAG TC 3' 2</p> <p>MHyVH11 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTG CAM CTG GTG GAG TC 3' 2</p> <p>MHyVH12 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC 3' 2</p> <p>MHyVH13 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTG CAR CTT GTT GAG TC 3' 1</p> <p>MHyVH14 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTR AAG CTT CTC GAG TC 3' 2</p> <p>MHyVH15 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTG AAR STT GAG GAG TC 3' 2</p> <p>MHyVH16 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTT ACT CTR AAA GWG TST G 3' 5</p> <p>MHyVH17 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTC CAA CTV CAG CAR CC 3' 3.5</p> <p>MHyVH18 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTG AAC TTG GAA GTG TC 3' 0.7</p> <p>MHyVH19 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CTC GAG GTG AAG GTC ATC GAG TC 3' 0.7</p> <p><b>VH 3' Reverse Primers</b></p> <p>MHyIgGCH1-B1 5' CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT 3' 1</p> <p>MHyIgGCH1-B2 5' CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT 3' 1</p> <p>MHyIgGCH1-B3 5' CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT 3' 1</p> <p>MHyIgGCH1-B4 5' CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT 3' 1</p>	VH ratón
<p><b>Primers for Amplification of the Human C<sub>k</sub> Region and the pelB Leader Sequence from a Cloned Human Fab</b></p> <p>HKC-F (sense) 5' CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC 3'</p> <p>Lead-B (reverse) 5' GGC CAT GGC TGG TTG GGC AGC 3'</p>	CK humana
<p><b>Primers for Amplification of the Human CH1 Chain from a Cloned Human Fab</b></p> <p>HIgGCH1-F (sense) 5' GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC</p> <p>3dpseq (reverse) 5' AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC 3'</p>	CH1 humana

<b>Primers for PCR Assembly of Mouse VL Sequences with the Human Cx PCR Product</b> RSC-F (sense) 5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GCG GGG CCC AGG CGG CCG AGC TC 3' Lead-B (reverse) ((mismo anterior)	VLratón-CKhumana
<b>Primers for PCR Assembly of Mouse VH Sequences with the Human CH1 PCR Product</b> leadVH (sense) 5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC 3' dpseq (reverse) (mismo anterior)	VHratón-CH1humana
<b>Primers for PCR Assembly of Chimeric Light-chain Sequences with Chimeric Heavy-chain (Fd) Sequences</b> RSC-F (sense) (mismo anterior) dp-EX (reverse) 5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC 3' Primers tomados de (Barbas, 2001 #5268)	Fab químérico

**Tabla M.3: Primers empleados en la obtención de anticuerpos simple cadena (scFV)**

Primers para scFv de ratón linker largo y corto	Amplificación
<b>Vκ 5' Sense Primers</b> (mismos empleados en la quimerización de Fabs) <b>Reverse</b> Linker corto (GGSSRSS) MSCJK12-B 5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC TTT KAT TTC CAG YTT GGT CCC 3' 2 MSCJK4-B 5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC 3' 1 MSCJK5-B 5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC 3' 1  Linker largo (SSGGGSSGGGGSSRSS) MSCJK12-BL 5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA TTT KAT TTC CAG YTT GGT CCC 3' 2 MSCJK4-BL 5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC 3' 1 MSCJK5-BL 5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC 3' 1	VL ratón
<b>VH 5' Sense Primers</b> MSCVH1 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTR MAG CTT CAG GAG TC 3' 4 MSCVH2 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC 3' 4 MSCVH3 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG CAG CTG AAG SAS TC 3' 3 MSCVH4 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC 3' 4 MSCVH5 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTY CAG CTB CAG CAR TC 3' 7 MSCVH6 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTY CAR CTG CAG CAG TC 3' 2 MSCVH7 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTC CAC GTG AAG CAG TC 3' 1 MSCVH8 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAS STG GTG GAA TC 3' 2 MSCVH9 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AWG YTG GTG GAG TC 3' 5 MSCVH10 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG CAG SKG GTG GAG TC 3' 2 MSCVH11 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG CAM CTG GTG GAG TC 3' 2 MSCVH12 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC 3' 2 MSCVH13 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG CAR CTT GTT GAG TC 3' 1 MSCVH14 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTR AAG CTT CTC GAG TC 3' 2 MSCVH15 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAR STT GAG GAG TC 3' 2 MSCVH16 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTT ACT CTR AAA GWG TST G 3' 5 MSCVH17 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTC CAA CTV CAG CAR CC 3' 3.5 MSCVH18 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAC TTG GAA GTG TC 3' 0.7 MSCVH19 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAG GTC ATC GAG TC 3' 0.7  VH 3' Reverse Primers (Specific for the 5' End of the First Constant Regions) MSCG1ab-B 5' CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TGA CAG ATG GGG STG TYG TTT TGG C 3' 3 MSCG3-B 5' CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TGA CAG ATG GGG CTG TTG TTG T 3' 1 MSCM-B 5' CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TGA CAT TTG GGA AGG ACT GAC TCT C 3' 1	VH ratón
<b>Overlap Extension Primers</b> RSC-F (sense) 5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GCG GGG CCC AGG CGG CCG AGC TC 3' RSC-B (reverse) 5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TG 3' Primers tomados de (Barbas, 2001 #5268)	scFv

### 1.6.2 Obtención de las construcciones secRFP y RFP-TMCT

TABLA M.4: Secuencias de los primers utilizados para amplificar las construcciones de interés.

Primer	Tipo	Secuencia
RFP (KpnI)	Forward	5' -GC <u>GGTACC</u> CCAGATCTACC <u>ATG</u> GCCTCCTCC-3'
RFP (XbaI)	Reverso	5' -AGCATCTAGATCAGAGAGCTCCCGTGTGACGGCGCCGGTGGAG-3'
SP	Forward	5' -CACCA <u>TG</u> GGCTGGAGCTGGATC-3'
RFPTMCT (F1)	Forward	5' -TCCACCGGCGCCTGCCTTAATCCGCCAGACAG-3'
RFPTMCT (R1)	Reverso	5' -TGGCGGATTAAGGCAGGCGCCGGTGGAG-3'
TMCT	Reverso	5' -GCGTCTAGAT <u>CA</u> ACGGCTTTGACTGG-3'

### 1.6.3 Obtención de las construcciones del anticuerpo 2G3 completo fusionados a distintas señales de direccionamiento

TABLA M.5: Secuencias de los primers utilizados para amplificar las construcciones de interés.

Primer	Secuencia
SPextK	5' CACCATGGGCTGGAGCTGGATCTTTCTCTTCTCCTGTGTCAGGAGCTGCAGGTGGGTACCC CAGAATGACACAGTCTCCACTCTCC 3'
KvR	5' GCCTCCACCGAATTTTATTTCCAGCTTGGTC 3'
CkF	5' GGAAATAAAATTCGGTGGAGGCACAAGCTG 3'
CkR	5' GACGTCTTCGGAGGAGCCATGGCGGCCACACTCATTCTGTGAAGC 3'
K-RFPford	5' GCTTCAACAGGAATGAGTGTGGGGCCGATGGCCTCCTCCGAGGACG 3'
PrAFVYrev	5' GCGTCTAGATCAGTACACAAAGGCGCCGGTGGAG 3'
SPextG	5' CACCATGGGCTGGAGCTGGATCTTTCTCTTCTCCTGTGTCAGGAGCTGCAGGTGGGTACCC CAGAATGTCTGCAAGGCTTCTGG 3'
γvRev	5' CAGATGGGGGTGAGGAGGCGGTGACTG 3'
CH1F	5' CGCCTCCTCACCCCATCTGTCTATCCAC 3'
CH3R	5' GATGACGTCTTCGGAGGAGCCATGGCGGCCCTTTACCAGGAGAGTGGGAG 3'
G-RFPford	5' CTCCCACTCTCTGGTAAAGGGCCGCCATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATC 3'

## 1.7 Vectores con genes reporteros

En las construcciones reporteras generadas se utilizó la proteína fluorescente roja mRFP1 (Campbell *et al.* 2002) amplificada por PCR desde el plásmido pcDNA3.1-mRFP (Snapp *et al.* 2006). Esta proteína roja monomérica posee un espectro de emisión rojo y una fluorescencia más estable a pH bajos comparada con la GFP.

Los marcadores reporteros subcelulares utilizados en los ensayos de co-agroinfiltración fueron los siguientes: ST-YFP (Brandizzi *et al.* 2002), spGFP-HDEL (Boevink *et al.* 1996), c-TIP-YFP (Hunter *et al.* 2007) y Lti6b-eGFP (Cutler *et al.* 2000).

## Metodologías

### 2.1 Técnicas de ácidos nucleicos

#### 2.1.1 Aislamiento de RNA total

Se partió de un cultivo conteniendo aproximadamente  $10^6$  células de cada hibridoma, y se realizó una extracción de RNA empleando el reactivo Trizol (Invitrogen). Luego de la lisis celular provocada por este reactivo, el material insoluble se removió por centrifugación a 12000g a 4°C. El sobrenadante fue desproteinizado por extracción con cloroformo, precipitándose posteriormente el RNA de la fase acuosa con isopropanol. Luego de un lavado con etanol 70%, el RNA se resuspendió en agua tratada con DEPC. Se verificó la calidad del RNA obtenido empleando geles de agarosa desnaturizantes donde se observó la integridad de los RNA ribosomales 28S, 18S y 5S. Alternativamente para la extracción de RNA se utilizó también se empleo el kit comercial Macherey Nagel RNA Spin II siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

#### 2.1.2 Síntesis de la primera cadena del cDNA

El RNA fue desnaturizado por tratamiento a 70°C durante 5 minutos seguido de enfriamiento en hielo. La síntesis de la primera cadena del cDNA se realizó aproximadamente con 300 ng de RNA total, los primers poli-dT o PM1 y hexámero al azar (aportados por Kit *Cloned AMV First-strand cDNA synthesis* de Invitrogen) o bien primers específicos: 2 pmoles del primer reverso específico para kappa (primer 11) o gamma (21-25) y 2mM dNTP final, 10mM DTT, buffer de la primera cadena 1X y Superscript II 200U (Invitrogen).

La mezcla de RNA + primers + dNTP's (12µl) preparada como se muestra en la siguiente tabla fue incubada a 65°C por 5 min. :

	Oligo-dT , hexámeros	Gen-especifico
RNA (40 ng/µl)	9 µL	7 µL
dNTPs 10mM	2 µL	2 µL
Primer	1 µL	3 µL

Luego se adiciona 8µl de mezcla de la reacción (conteniendo buffer DTT, y enzima) y la síntesis de la primera cadena se realizó a 45-55°C por 60 min. Cuando se emplearon los primers hexaméricos al azar luego de la incubación a 65°C, la mezcla es llevada a 25°C por 10 min para permitir el apareamiento de los primers.

Luego de la reacción de la transcriptasa reversa se desnaturizó la enzima por tratamiento a 85°C por 5 min.



### 2.1.3 Reacciones de PCR

Las mezclas de reacción utilizadas estándares se detallan a continuación:

Pfx DNA polimerasa		Taq DNA polimerasa	
Composición	Conc. Final	Composición	Conc. Final
Buffer Pfx(Invitrogen) 10X	1X	Buffer Taq DNApol (10X)	1X
MgSO4	1.5 mM	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5 mM
dNTPs (10mM c/u)	0.2 mM	dNTPs (10mM c/u)	0.2 mM
Primer forward (10 uM)	1.0 μM	Primer forward (10 uM)	1.0 μM
Primer reverse (10 uM)	1.0 μM	Primer reverse (10 uM)	1.0 μM
Taq DNApol (5 U/ul)	0,01u/μl	Taq DNApol (5 U/ul)	0,01u/μl
Enhancer Solution 10X	1X	H <sub>2</sub> O bidestilada para PCR	to 50 μl
H <sub>2</sub> O bidestilada para PCR	to 50 μl	Muestra de DNA	

Las reacciones de PCR se realizaron en el ciclador térmico Gradient MyCycler™ (Bio-Rad). El primer paso se denomina desnaturalización inicial. El segundo paso, comienza con una desnaturalización, luego hibridación a un Tannealing correspondiente a los primers utilizados y por ultimo, una temperatura de extensión optima para la enzima. El tercer paso, paso de extensión o amplificación adicional.

Perfil de ciclado estándar:

Paso 1	Paso 2			Paso 3	Paso 4
1 ciclo	30 ciclos			1 ciclo	1 ciclo
98°C	94°C	55°C	72°C(taq)/68°C(pfx)	72°C	4°C
1 min	10 seg	10 seg	1kb/min	10 min	hold

El tiempo de elongación a 72°C (Taq DNA pol) o 68°C (pfx DNA pol) 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.

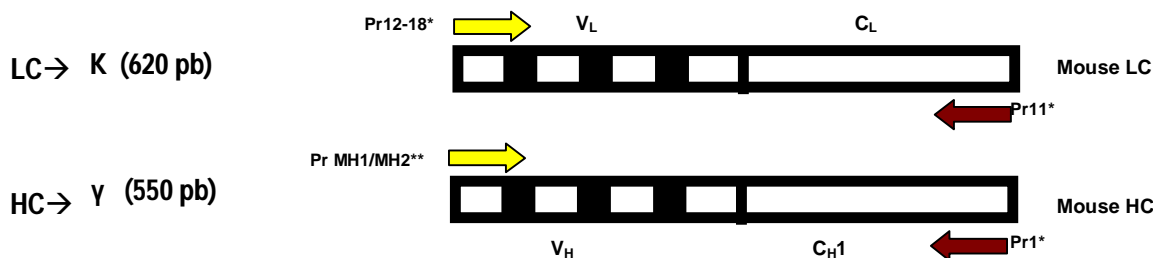
### 2.1.3.1 Amplificación de la $\beta$ -actina

Para analizar la calidad de síntesis del cDNA, se utilizaron primers diseñados sobre el gen de la  $\beta$ -actina que permiten amplificar un fragmento de 541 pb y descartar además la presencia de contaminación con DNA genómico. Las condiciones de la PCR para la  $\beta$ -actina fueron:

Componente	Concentración	Parámetro	Valor
[dNTPs]	0,4 mM	$T_{ann}$	50°C
[Mg <sup>2+</sup> ]	2 mM	$t_{ann}$	30s
[Primer 5'] (5act)	0,5 $\mu$ M	$t_{desn}$	30s
[Primer 3'] (3act)	0,5 $\mu$ M	$n$	30 ciclos
[Taq] (Fermentas <sup>®</sup> )	1,25 U/50 $\mu$ L	$t_{pol}$	1 min
[cDNA]	4% v/v		

### 2.1.3.2 Amplificación de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas

Para la amplificación de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas, se utilizaron las siguientes condiciones: 20mM Tris pH 8.4/ 50mM KCl/ 1.5-2.5mM MgCl<sub>2</sub>/ 0.4mM dNTP/ 0.5pmoles/ $\mu$ l de cada primer/Taq polimerasa 2.5U/100 $\mu$ l (Invitrogen/Fermentas). Se varió la cantidad de cDNA en la mezcla de reacción, cantidad de Mg y la temperatura de annealing entre 40-55°C, sin embargo las amplificaciones se lograron con:



Componente	kappa	Gamma	Parámetro	Valor
[dNTPs]	0,4 mM	0,4 mM	$T_{m\acute{a}x}$	60°C
[Mg <sup>2+</sup> ]	2 mM	2 mM	$\Delta t$	0,5°C (n=16)
[Primer 5'] (Pr12-18 ó PrMH1-MH2)	0,75 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	$T_{m\acute{i}n}$	52°C
[Primer 3'] (Pr11 ó Pr1)	0,5 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	$nT_{m\acute{i}n}$	20ciclos
[Taq] (Fermentas <sup>®</sup> )	1,25 U/50 $\mu$ L	1,25 U/50 $\mu$ L	$t_{desn}$	20s
[cDNA]	1% v/v	1% v/v	$T_{ann}$	40s
			$t_{pol}$	1 min 15 s

### 2.1.3.3 Amplificaciones por OE (*overlap extension*) para obtener Fab quiméricos

Para la amplificación de los dominios variable de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas murinas, y fusionarlas a los dominios constantes humanos se realizaron varios pasos de PCR. Las secuencias de los primers empleadas de detalla en la Tabla M.2.

En la **primera ronda de PCR**, se amplificaron por un lado, los dominios variables del pComb3H Fab murino (1ng/ul) y por otro lado, los dominios constantes humanos del pCom3XTT (0.2ng/ul) y se utilizaron las siguientes condiciones de PCR:

Componente	Concentración	Parámetro	Valor
[dNTPs]	2.5 mM	Tann	56°C
[Mg <sup>2+</sup> ]	1.5-2.5 mM	tann	30s
[Primer 5'] (5act)	0.6 pmoles/ul	t <sub>desn</sub>	15s
[Primer 3'] (3act)	0.6 pmoles/ul	n	30 ciclos
[Taq] <i>Phire</i> <sup>®</sup>	0.5U	t <sub>pol</sub>	90s
Bf10X	1X		
[molde]	1ng/ul		

La taq polimerasa empleada fue la *Phire*<sup>®</sup> Hot Start DNA Polymerase (Finnzymes).

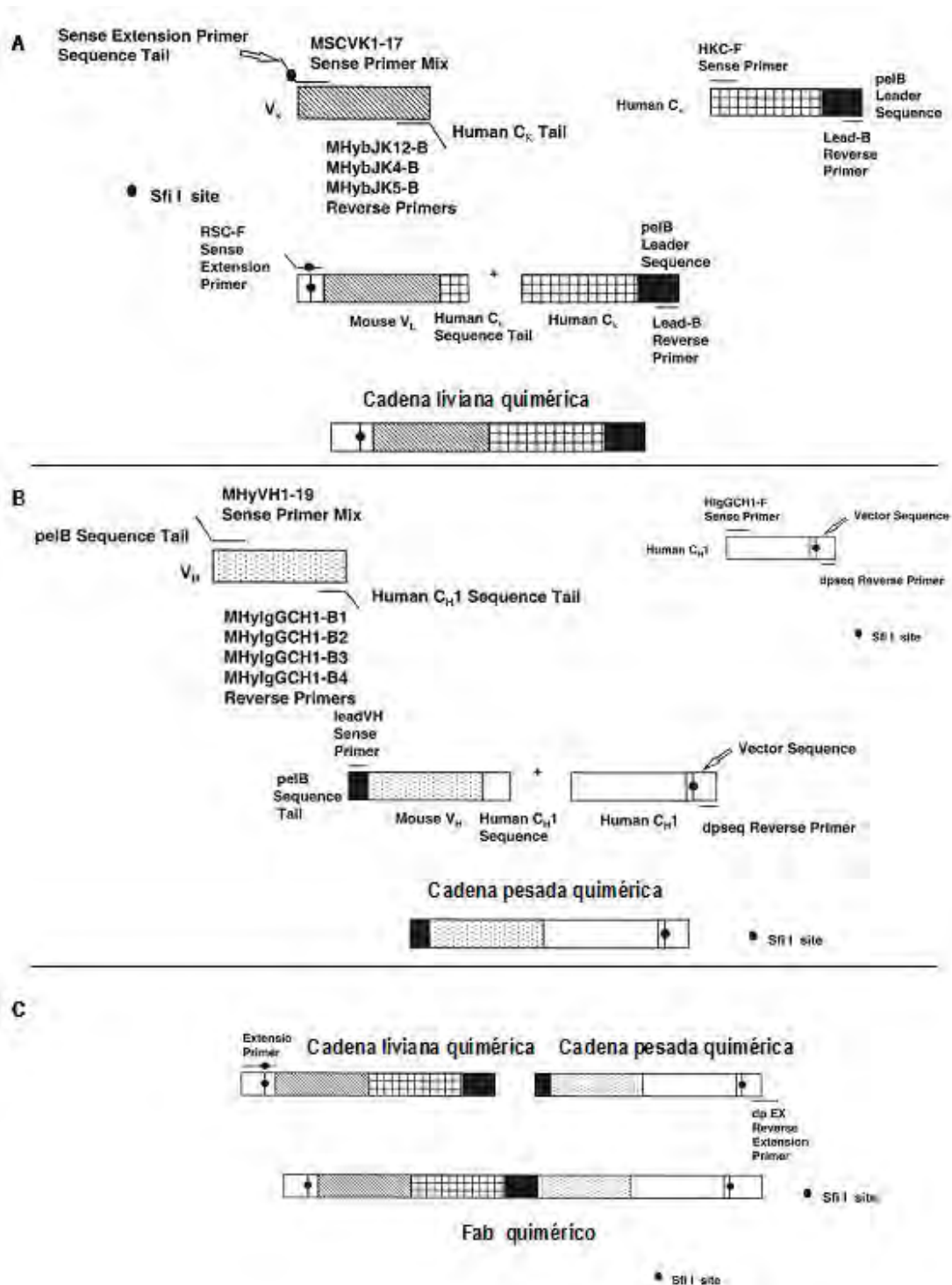
Los primers que se utilizaron en a la amplificación de los dominios variables murinos del pComb3H Fab murino, específicamente, la secuencia V<sub>k</sub> de la cadena liviana son los primers directos MSCVK primers 1–17 y reversos MHybJK12-B, 4-B y 5-B, y para la amplificación de la secuencia V<sub>H</sub> de la cadena pesada son los primers directos MHyVH1–19 y reversos MHygGCH1-B1 a B4.

Los primers que se utilizaron en a la amplificación de los dominios constantes humanos del pCom3XTT, específicamente, la secuencia C<sub>k</sub> de la cadena liviana, la cual fue fusionada en el carboxilo terminal al péptido señal pelB, son los primer directo HKC-F y reverso Lead-B, y para la amplificación de la secuencia CH1 de la cadena pesada, son el primer directo HlgGCH1-F y reverso dpseq.

Los productos de amplificación de las regiones variables murinas son de aprox. 350 pb y el producto de fusión C<sub>k</sub>-pelB de la cadena liviana de 400pb y CH1 humano de 350 pb.

En la **segunda ronda de PCR** (primer paso de fusión), se fusionan los dominios variables murinos con los dominios constantes humanos y se utilizaron las siguientes condiciones de PCR, y como moldes los producto de amplificación purificado de V y de C de la primer ronda de PCR (1ng/ul).

Componente	Concentración	Parámetro	Valor
[dNTPs]	2.5 mM	Tann	56°C
[Mg <sup>2+</sup> ]	1.5-2.5 mM	tann	30s
[Primer 5'] (5act)	0.6 pmoles/ul	t <sub>desn</sub>	15s
[Primer 3'] (3act)	0.6 pmoles/ul	n	30 ciclos
[Taq] <i>Phire</i> <sup>®</sup>	0.5U	t <sub>pol</sub>	2min
Bf10X	1X		
[molde]	1ng/ul		



**Figura M.1:** Esquema de las ampliaciones por OE-(overlap extension) PCR para obtener Fab quiméricos. Los paneles A y B muestran los OE-PCR utilizados para obtener las cadenas livianas (VL ratón-CKhumano) y pesadas (VHratón-CH1humano), respectivamente. El Panel C esquematiza la obtención del Fab. Los productos de la última reacción de PCR fueron clonados en pComb3XTT o pMalPSS (Esquema adaptado de Barbas et al 2001).

Los primers que se utilizaron en la generación de la cadena liviana quimérica son los primers directo RSC-F primer y reverso Lead-B, y de la cadena pesada quimérica son los primers directo leadVH (que agrega región del péptido señal pelB) y dpseq. Los productos de amplificación de la cadena liviana quimérica son de aprox. 800 pb y de la cadena pesada quimérica de aprox. 750 pb.

En la **tercera ronda de PCR** (segundo paso de fusión), se realiza la fusión final de ambas cadenas liviana y pesada quiméricas generadas, para producir el Fab quimérico y se utilizaron las siguientes condiciones de PCR, y como molde producto de amplificación de la cadena liviana y pesada quimérica (1ng/ul). Se emplea la Taq polimerasa Expand High Fidelity polymerase (Roche®).

Componente	Concentración	Parámetro	Valor
[dNTPs]	2.5 mM	Tann	56°C
[Mg <sup>2+</sup> ]	1.5-2.5 mM	tann	30s
[Primer 5'] (5act)	0.6 pmoles/ul	t <sub>desn</sub>	15s
[Primer 3'] (3act)	0.6 pmoles/ul	n	10 ciclos
[Taq]	0.75 ul/100ul	t <sub>pol</sub>	3min
Bf10X	1X		
[molde]	1ng/ul		

Los primers que se utilizaron en la generación del Fab quimérico son los primers directo RSC-F primer y reverso dpEX y el producto es de aprox. 1500 pb.

#### 2.1.3.4 Amplificaciones por OE (*overlap extension*) para obtener scFV murinos (VL-VH)

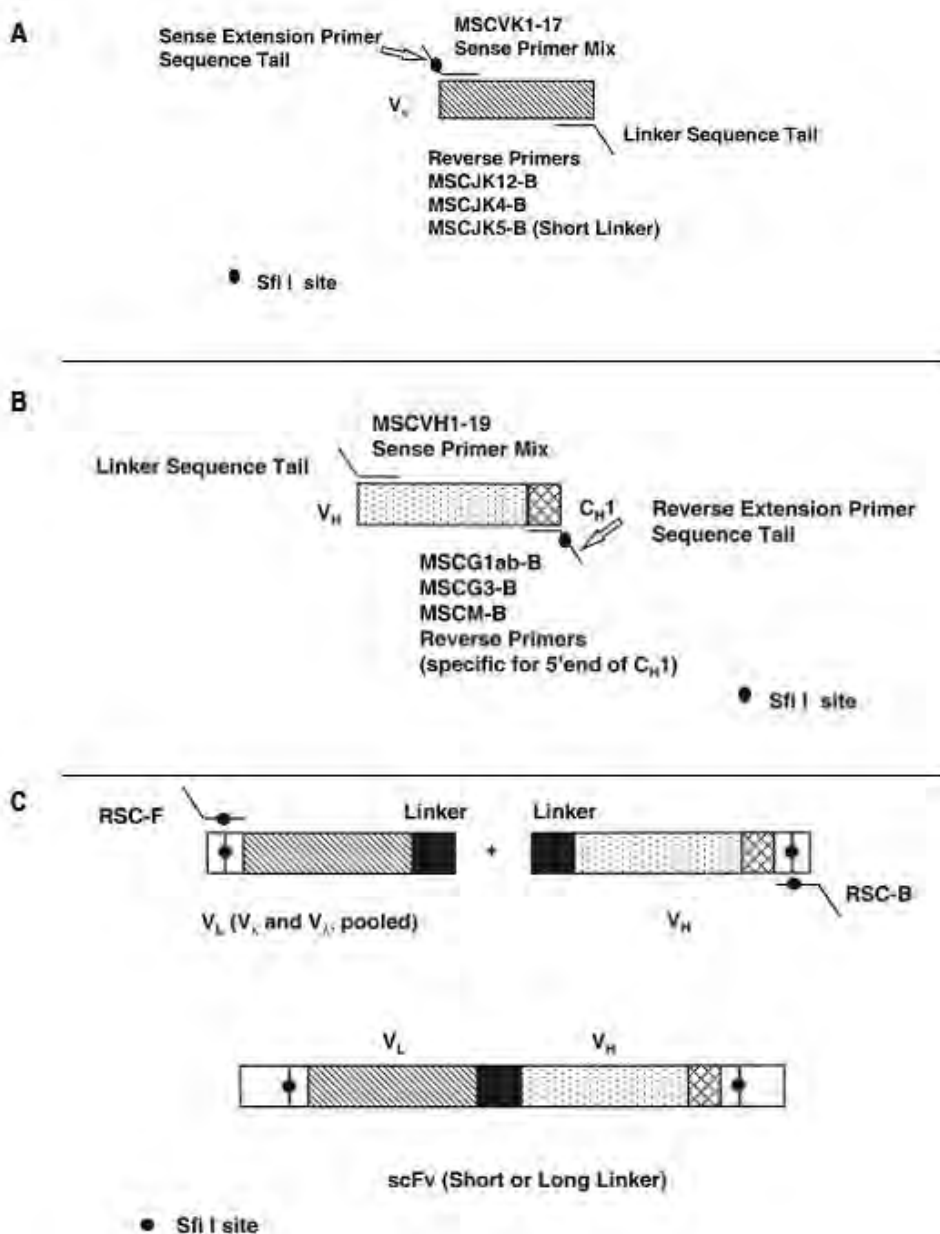
Los scFv fueron obtenidos siguiendo el esquema mostrado en la Figura II.14 y los primers mostrados en la Tabla M.3. Las condiciones de reacción se describen a continuación (Barbas 2001).

En la **primera ronda de PCR**, se amplificaron los dominios variables del pComb3H Fab murino (1ng/ul) y se utilizaron las siguientes condiciones de PCR.

Componente	Concentración	Parámetro	Valor
[dNTPs]	2.5 mM	Tann	56°C
[Mg <sup>2+</sup> ]	1.5-2.5 mM	tann	30s
[Primer 5'] (5act)	0.6 pmoles/ul	t <sub>desn</sub>	15s
[Primer 3'] (3act)	0.6 pmoles/ul	n	30 ciclos
[Taq] ( <i>Phire</i> ®)	0.5U	t <sub>pol</sub>	90s
Bf10X	1X		
[molde]	1ng/ul		

Los primers que se utilizaron en a la amplificación de los dominios variables murinos del pComb3H Fab murino, específicamente, la secuencia VL de la cadena liviana son los primers directos MSCVK1-17 y reversos MSCJK-B 12-B, 4-B y 5-B que adicionan la secuencia del péptido de unión corto, y para la amplificación de la secuencia V<sub>H</sub> de la cadena pesada son los primers directos MSCVH1-19 que adicionan la

secuencia del péptido de unión corto y reversos MSCG1ab-B, MSCG3-B, MSCM-B. Los productos de amplificación son de aprox. 350 pb.



**Figura M.2: Esquema de las amplificaciones por PCR para obtener los anticuerpos simple cadena (scFv).** Los paneles A y B esquematizan las reacciones de PCR utilizadas para obtener las regiones variables de las cadenas livianas y pesadas fusionadas a las secuencias los linker corta. El Panel C representa la última etapa de construcción de los scFv, un OE-PCR con los productos de las reacciones de los paneles A y B, que son clonados en pComb3XTT o pMalPSS. (Esquema adaptado de Barbas et al 2001).

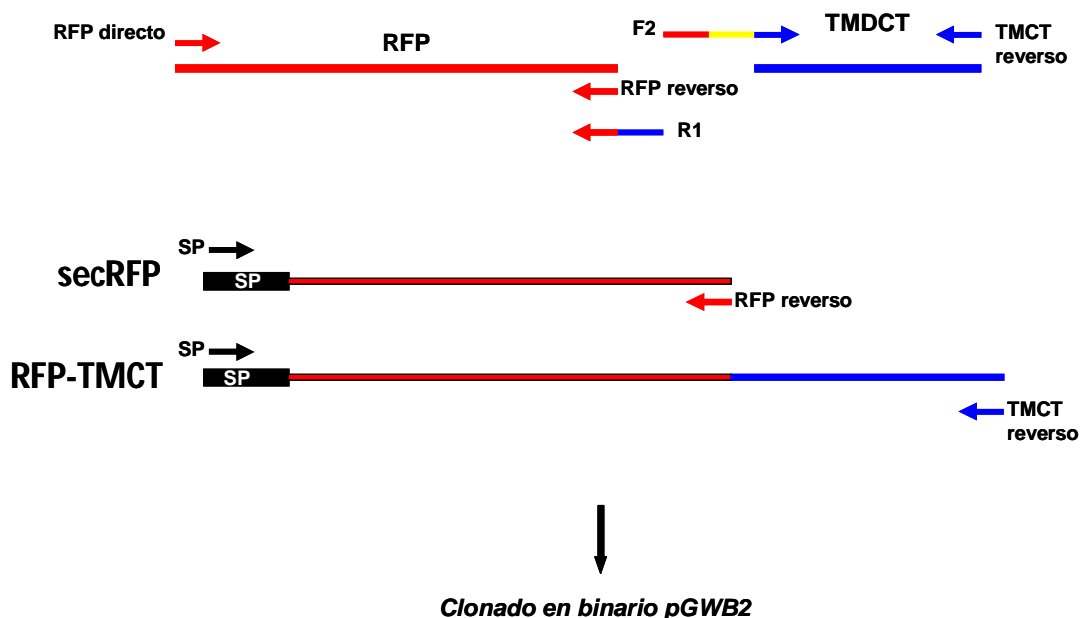
En la **segunda ronda de PCR** (primer paso de fusión), se fusionan entre si los dominios variables murinos mediante el solapamiento de la secuencia del péptido de unión corto adicionado y se utilizaron las siguientes condiciones de PCR y como molde los productos de amplificación purificado de VL y VH de la primer ronda de PCR (1ng/ul).

Componente	Concentración	Parámetro	Valor
[dNTPs]	2.5 mM	Tann	56°C
[Mg <sup>2+</sup> ]	1.5-2.5 mM	tann	30s
[Primer 5'] (5act)	0.6 pmoles/ul	t <sub>desn</sub>	15s
[Primer 3'] (3act)	0.6 pmoles/ul	n	30 ciclos
[Taq] ( <i>Phire</i> ®)	0.5U	t <sub>pol</sub>	2min
Bf10X	1X		
[molde]	1ng/ul		

Los primers que se utilizaron son el directo RSC-F y reverso RSC-B y el producto es de aprox. 700 pb.

### 2.1.3.5 Amplificación de las construcciones secRFP y RFP-TMCT

Para obtener los reporteros secRFP y RFPTMCT el esquema que se siguió es el que se detalla y los primers utilizados fueron descritos en materiales.



Se utilizaron las DNA polimerasas termoestables Taq y Pfx en mezclas de reacción en condiciones estándares en todos los casos. La amplificación de RFP fue a partir del vector pcDNA3.1-mRFP (Snapp y col. 2006) usando los primers RFP directo y RFP reverso. El primer RFP directo fue diseñado para fusionar RFP en marco con el péptido señal de una inmunoglobulina secretoria murina en el vector pRTL202 (Carrington y col. 1991) con las enzimas de restricción KpnI/XbaI para generar secRFP. El templado secRFP se utilizó

como molde para las construcciones posteriores. Para generar la construcción RFP-TMCT, se amplificó por un lado RFP con los primers RFP directo y R1 reverso (adiciona secuencias de homología con TMCT) y por otro lado, se amplificó TMCT del vector pUni51- AtRMR1 (Arabidopsis stock) con los primers F2 directo y TMCT reverso. Ambos productos de PCR fueron fusionados por una tercera PCR con los primers SP y TMCT reverso generando RFP-TMCT mediante el empleo de la Taq polimerasa Pfx. Luego los productos de PCR de las construcciones de interés fueron clonados mediante el sistema de recombinación Gateway (Invitrogen Argentina, SA, Buenos Aires, Argentina) en un vector de entrada pENTR D-Topo y el vector de destino binario pGWB2 (Nakagawa y col. 2007).

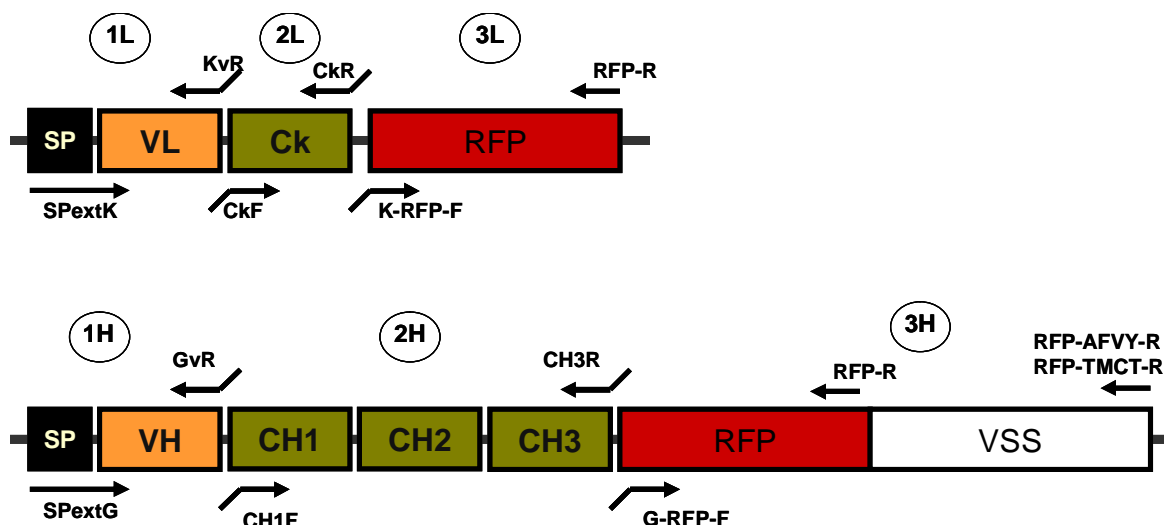
El perfil de ciclado fue estándar modificando, las temperaturas de *annealing* (Tann) de acuerdo a los primers utilizados, la temperatura de polimerización según el empleo de la DNA polimerasas termoestables Taq (72°C) y Pfx (68°C). En todos los casos la temperatura de annealing fue a 55°C, excepto para el juego de primers RFP directo y RFP reverso que fue a 60°C.

Componente	Concentración	Parámetro	Valor
[dNTPs]	0.2 mM	Tann	X°C
[Mg <sup>2+</sup> ]	1.5 mM	tann	10s
[Primer 5'] (5act)	1.0 µM	t <sub>desn</sub>	10s
[Primer 3'] (3act)	1.0 µM	n	25 ciclos
[Taq] (Fermenta®)	0.5U	t <sub>pol</sub> 72°C(taq)/68°C(pfx)	2 min
Bf10X	1X		
[molde]	1ng/ul		

#### 2.1.3.6 Amplificación de las construcciones LC-FP, HC-RFP, HC-FP-AFVY, HC-FP-TMCT

Para obtener los reporteros LC-FP, HC-RFP, HC-FP-AFVY, HC-FP-TMCT el esquema que se siguió es el que se detalla y los primers utilizados fueron descritos en materiales. Se utilizaron las DNA polimerasas termoestables Taq en la generación de fragmentos simples, *Phire*® Hot Start DNA Polymerase en las reacciones de PCR de fusión y Pfx en la amplificación final para el clonado en el sistema Gateway. La amplificación de los dominios variables fue a partir del vector pComb3X-Fab-2G3 #2. La amplificación de los dominios constantes fue a partir del pKappa 14D9 y pGamma 14D9 (Petruccelli y col. 2006). La amplificación de las proteínas fluorescentes con o sin señal de direccionamiento vacuolar fue los plásmidos de secRFP, RFP-AFVY (Hunter et al. 2007) y RFP-TMCT.





En principio, las regiones variables tanto de la cadena pesada como liviana (VH y VL) del Fab 2G3 quimérico que mostraron afinidad por el antígeno se fusionaron con los dominios constantes murinos kappa (ck) y gamma-1 (CH1-CH2-CH3), generando un anticuerpo completo murino. Esto consistió en una primera reacción de PCR amplificando los dominios variables con el péptido señal murino con los primers que se detallan en el esquema, generando 1L y 1H. La segunda reacción de PCR consistió en amplificar los dominios constantes murinos generando 2L y 2H. La tercera reacción de PCR, una PCR de fusión, se basó en generar la fusión entre los dominios variables y los dominios constantes amplificados, nombrados LC y HC.

Luego las cadenas del anticuerpo 2G3 fueron fusionadas a la proteína fluorescente roja con o sin señal de direccionamiento vacuolar (AFVY y TMCT). Para ello, se amplificaron RFP, RFP-TMCT y RFP-AFVY utilizando un primer directo con secuencia en el extremo 3' que corresponde a la secuencia terminal de las cadenas pesadas, denominados fragmentos 3L y 3H. Luego, mediante una última PCR de fusión, utilizando como moldes ya sea LH y HC en combinación con RFP, RFP-TMCT y RFP-AFVY, se generan LC-FP con los primers SP ExtK y RFP-R, HC-RFP con los primers SP ExtG y RFP-R, HC-FP-AFVY con los primers SP ExtG y RFP-AFVY-R, HC-FP-TMCT con los primers SP ExtG y RFP-TMCT-R.

#### **2.1.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

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

#### **2.1.5 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa utilizando un kit comercial (HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Mini-kit, RealGenomics™)**

Para la purificación de los fragmentos amplificados por PCR y de fragmentos provenientes de digestión enzimática de plásmidos se utilizó el kit de purificación HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction minikit, (BioAmerica Inc) procediendo según lo recomienda el fabricante. Se cortaron las bandas del gel de agarosa que poseían los fragmentos relevantes de DNA y se colocaron en un tubo de 1,5 ml adicionando posteriormente 0,5 ml de buffer de dilución (DF buffer) y mezclando en vortex. Las muestras se incuban a 55°C durante 10 o 15 minutos y luego se dejan enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Las muestras se transfieren a las columnas de purificación (DF Column) donde son sometidas a varios pasos de lavado y finalmente el DNA es eluido de la columna con agua bidestilada estéril y recuperado en un tubo de 1,5 ml estéril. Las muestras de DNA recuperadas fueron, en todos los casos, almacenadas a -20°C.

#### **2.1.6 Minipreparación de DNA plasmídico**

La purificación de DNA plasmídico se realiza mediante el método de lisis alcalina utilizando el kit comercial **Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System** de Promega.

El protocolo es el siguiente:

1. Entre 1–10ml de cultivo bacteriano crecido overnight se centrifuga a 13,000rpm por 5 minutos.
2. El pellet bacteriano se resuspende con 250µl de solución de Resuspension.
3. Agrega 250µl de Buffer Lisis a cada muestra y se invierte 4 veces para mezclar.
4. Agrega 10µl de Solución proteasa alcalina y se invierte 4 veces para mezclar. Se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Agrega 350µl de Buffer de Neutralización of Neutralization Solution y se invierte 4 veces para mezclar.
6. Centrifuga a máxima velocidad por 10 minutos a temperatura ambiente.

### **Union de DNA plasmídico**

7. Insertar la columna en el tubo colector.
8. Agregar en la columna el sobrenadante obtenido.
9. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente y descartar el *flowthrough*. Insertar nuevamente la columna en el tubo colector.

### **Lavado**

10. Agrega 750µl de Solución de lavado. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto y descartar el *flowthrough*. Insertar nuevamente la columna en el tubo colector.
11. Repetir el paso 10 con 250µl de Solución de lavado.
12. Centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos a temperatura ambiente.

### **Elución**

13. Transferir la columna a un eppendorf de 1.5ml.
14. Agrega 50µl de agua libre de nucleasas. Centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos a temperatura ambiente.
15. Descartar la columna y almacenar el DNA a -20°C.

## **2.1.7 Digestiones enzimáticas**

Para las digestiones con enzimas de restricción se utilizaron como condiciones estándares: 500 ng de DNA purificado, 5 U de enzima, buffer de restricción 1X apropiado en un volumen final de 50 µl. Las reacciones se incubaron toda la noche a 37 °C.

### **2.1.7.1 Productos de PCR y Vector con *Sfi***

Las digestiones enzimática con *Sfi* (Roche Molecular Biochemicals) consistieron en:

Para productos de amplificación de PCR purificados: 10ug de producto de PCR purificado, 160U *Sfi*, 20 ul Buffer de restricción M y agrego agua hasta un volumen final de 200ul.

Para vectores: 20ug del vector (pComb3HSS or pComb3XSS que contienen "secuencias relleno" entre los sitios *Sfi*), 120U *Sfi*, 20 ul Buffer de restricción M y agrego agua hasta un volumen final de 200ul.

Las digestiones son incubadas por 5 horas a 50°C.

## **2.1.8 Estrategias de clonados**

### **2.1.8.1 TOPO-TA Cloning® (Invitrogen)**

El clonado de los productos de PCR no requiere un paso de ligación convencional, en donde el inserto es introducido en el plásmido mediante la reacción TOPO que utiliza la enzima TOPO isomerasa que se encuentra conjugada al vector. El producto amplificado mediante PCR fue clonado directamente en el pCRII-TOPO-TA® (Invitrogen) del kit Topo-TA Cloning de acuerdo con la metodología que recomienda el fabricante. En donde 2ul producto amplificado con Taq DNA polimerasa es mezclado con 0.5 ul solución salina y 0.5 ul vector TOPO®. Se Incubo 30 minutos a temperatura ambiente y se transforma en células competentes químicas de *E. coli* One shot Top10 mediante shock térmico. Se seleccionaron las colonias de color blanco cultivadas en placas de agar LB con 1 mM de isopropil-β-D-Thiogalactopiranósido\*\*\* (IPTG) y 40 µg de X-Gal.

### **2.1.8.2 Clonado en el sistema Gateway (Invitrogen)**

#### **2.1.8.2.1 pENTR-D-TOPO y Recombinación sitio específica (LR clonasa)**

El clonado de fragmentos de PCR amplificados con pfx se realizó en el plásmido pENTR. El protocolo de la reacción fue modificado, se puso en contacto 1-5 ng del fragmento amplificado con 1 µl del vector pENTR-D-TOPO agregando 1 µl de solución salina. Este volumen se incubó a temperatura ambiente durante 2 hs y se utilizó la mezcla completa de la reacción para transformar células competentes químicas de *E. coli* One shot Top10 mediante shock térmico. Las células se incubaron en medio agar LB a 37 °C por 24 hs seleccionando a través de la resistencia a kanamicina.

Dado que el vector de entrada y destino poseen la misma resistencia, se realizó la recombinación sitio específica (LR clonasa) utilizando 4 µl del fragmento liberado por incubación con MluI del vector pENTR que contenía el inserto de interés (fragmento que fue purificado del gel de electroforesis) y 1 µl del vector de destino (100 ng/µl) pGBW2, con 1 µl la enzima LR clonasa. Se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Luego de este paso se adicionaron 2 µl de proteinasa K para inactivar la enzima incubando 10 min. a 37 °C. Con la mezcla obtenida se transformaron células competentes One Shot® Chemically Competent *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Posteriormente se seleccionaron las transformantes mediante la selección en medio agar LB con Kanamicina (antibiótico correspondiente a la resistencia codificada en el vector pGBW2).

#### **2.1.8.2.2 pCR®/GW/TOPO y Recombinación sitio específica (LR clonasa)**

La amplificación del producto de PCR es con la Taq DNA polimerasa y se clona en el vector pCR8/GW/TOPO con resistencia a espectinomicina. La reacción TOPO se lleva a cabo con 5 ng del producto de PCR, 1ul de

solucion salina y 1 ul del vector TOPO. Se incuba *overnight* a 25°C y transforma células competentes One Shot® Chemically Competent E. coli TOP10 (Invitrogen), y se selecciona con espectinomicina. Se selecciona el clon positivo y realiza miniprep. Luego se procede a la reacción LR para el clonado en el vector binario pGWB2 como se describe en 2.1.8.2.1.

### **2.1.8.3 Fab quiméricos**

Se realizaron distintos PCR como se muestra en la Figura II.11 y los primers mostrados en la Tabla M.2. Las condiciones de reacción fueron las descritas {Barbas, 2001 #5268}. Para la reacción de PCR de quimerización final fue necesario emplear un Hot Start PCR y la Polimerasa Expand Hifi (Roche) o alternativamente una mezcla Pfu-Taq. El producto de la última reacción de PCR fue digerido con *Sfi I* (Roche) y clonado en pComb3XSTT también cortado con la misma enzima y al que se le había eliminado “las secuencias relleno” para eliminar el background en el clonado. Este producto de PCR también fue clonado el pMal-PSS también empleando los sitios de restricción *Sfi I*.

### **2.1.8.4 scFV murinos (VL-VH)**

Los scFv fueron obtenidos siguiendo el esquema mostrado en la Figura II.14 y los primers mostrados en la Tabla M.2. Las condiciones de reacción se describen a continuación (Barbas 2001). Los productos de la reacción fueron digeridos con *Sfi I* (Roche) y clonado en pComb3XSTT y pMal-PSS.

### **2.1.9 Colony-PCR**

Este método fue utilizado como screening durante el clonado en el presente trabajo.

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

### **2.1.10 Secuenciación**

Los productos de PCR de las cadenas pesadas y livianas (LC y HC) clonados en el vector pCRII-TOPO-TA® (Invitrogen) fueron secuenciados por la empresa Macrogen (Corea).

## 2.2 Herramientas bioinformáticas

### 2.2.1 Diseño de estrategias de clonado

**CLONE MANAGER:** para el diseño de estrategias de clonado, primers y verificación por enzimas de restricción.

### 2.2.2 Análisis de secuencias

**BLAST X** (*Translated Basic Local Alignment Search Tool*): para la confirmación de la identidad de los clones. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx>.

**IMGT (Base de datos de inmunogenes)**, <http://www.imgt.org/>, permite determinar las zonas "framework" y los determinantes de complementariedad (CDRs) y reverificar la presencia de arreglos funcionales producidos durante las combinaciones V-J (cadenas livianas) y V-D-J (cadenas pesadas), descartando de esta manera la presencia de arreglos no funcionales (pseudogenes). Esta base de datos reúne también información de todos los alelos de genes de inmunoglobulinas y otros componentes del sistema inmune, lo que permite realizar alineamientos para detectar mutaciones. También reúne resultados de estructura tridimensional de estas moléculas, lo que permite generar esquemas bidimensionales como los collares de perla para identificar los residuos de aminoácidos posiblemente más importante para la interacción antígeno anticuerpo (Lefranc 2011, Lefranc 2003, Ehrenmann 2010, Kaas 2004, Ehrenmann 2011, Giudicelli 2004, Giudicelli 2011).

## 2.3 Manipulación de bacterias-*E. coli* y *Agrobacterium tumefaciens*-

### 2.3.1 Preparación de células competentes de *E.coli* DH10

El siguiente protocolo corresponde al de  $\text{CaCl}_2$ . El principio de este método consiste en que el calcio desestabiliza la membrana externa de bacterias Gram negativas (cargadas negativamente) dejándolas susceptibles a la entrada de macromoléculas.

Es de suma importancia que todo el procedimiento sea realizado en un ambiente estéril sin corrientes de aire y cerca de un mechero prendido. Recuerde que estará trabajando con cepas bacterianas sin resistencia a ningún antibiótico, y por lo tanto sus medios de cultivo no poseen ningún antibiótico seleccionador

(1) Se plaquea la cepa bacteriana "no transformada" en una placa de agar LB "sin antibiótico". Este inóculo lo puede obtener desde un glicerol stock, los cuales son almacenados de preferencia a  $-80^\circ\text{C}$ .

(2) Incuba esta placa a  $37^\circ\text{C}$  durante 12 a 16 hr.

(2) Pica una colonia aislada e inócula un tubo de ensayo con 5 mL de medio LB sin antibiótico. Incuba a  $37^\circ\text{C}$  durante aprox. 12 hr. a 220 rpm.

- (3) Toma 1,0 mL del medio de cultivo anterior e inocule un matraz erlenmeyer con 100 mL de medio de cultivo LB sin antibiótico. Incube a 37°C a 220 rpm hasta obtener una densidad óptica de 0,5 a 600nm.
- (4) Cosecha el medio de cultivo centrifugando a 4800 rpm (rotor Sorvall SS34) por 10 minutos a 4°C.
- (5) Descarta el sobrenadante y resuspenda suavemente (no vorterear) en 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M a 4° C (10 mL por cada tubo SS34).
- (6) Dejar 10 minutos en hielo y centrifugar a 4800 rpm (rotor Sorvall SS34) por 10 minutos a 4°C.
- (7) Eliminar sobrenadante y resuspender suavemente (no vorterear) en 4 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M (2 mL por cada tubo SS34).
- (8) Para conservar estas células se deben mezclar 850 µL de sus células resuspendidas con 150µL de glicerol estéril en tubos de 1,5 mL. Agite durante 1 minuto en vortex y luego introduzca estos tubos en un recipiente con nitrógeno líquido. Posteriormente puede almacenar sus células competentes a -80° C.

### **2.3.2 Transformación química de células competentes de *E.coli* DH10 y One Shot® Top10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen)**

Se debe realizar este procedimiento en un ambiente estéril, sin corrientes de aire y cerca de un mechero prendido.

- El stock de células competentes se retira del freezer (-80°C) cinco minutos antes de llevar a cabo la transformación, siendo colocado inmediatamente en hielo.
- Se adiciona la preparación de plásmido (2 a 10 ng) a 50 µL de células competentes e incuba en hielo durante 30 minutos: el volumen a adicionar dependerá del origen de la preparación: 1µl para minipreparación de DNA proveniente de un kit comercial y en el caso de reacciones de ligación se utiliza toda la mezcla.
- Luego se incuba a 42° C durante 90 segundos la mezcla (puede usar una termoplaca o un baño térmico).
- Se deja en hielo por 3 minutos y luego agregue 500 µL de medio de cultivo LB sin antibiótico e incube a 37° C durante 45 minutos a 220 rpm.
- Tome 100 µL del cultivo anterior y agréguelo a una placa de 100 mm de medio de cultivo LB en agar. Esta placa deberá poseer un antibiótico seleccionador, el cual dependerá de la resistencia a antibiótico codificada en el plásmido incorporado en la cepa bacteriana.
- Opcionalmente, si la eficiencia de transformación es muy baja, puede realizar una breve centrifugación (spin down) de la mezcla inicial crecida en LB sin antibiótico, eliminar 400 µL del sobrenadante y resuspender el pellet bacterial en los 100 µL restantes, para luego plaquear la mezcla completa en la placa de medio de cultivo con el agente seleccionador.
- Incube durante 12-16 hr a 37°C.
- Como control se lleva a cabo el mismo procedimiento pero esta vez no se adiciona plásmido a las células, la aparición de colonias indicaría algún tipo de contaminación.

En el almacenamiento de stocks bacterianos: Se toma 850  $\mu$ L de suspensión de bacterias en medio de cultivo y agregar 150  $\mu$ L de Glicerol (puro y autoclavado), emplear criotubos herméticos y que resistan nitrógeno líquido. Agitar suavemente hasta homogeneidad y sumergir los criotubos en nitrógeno líquido. Almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.3. Expresión en *E. coli***

La expresión de las construcciones Fab y scFv en pComb3H, pComb3X y pMalP, se transformaron en la cepa de *E. coli* DH10 no supresora del tRNA para el codon ambar, evitando la fusión al gen III en las versiones en el pComb3X y pComb3H. Los mejores resultados en la puesta a punto de la expresión fueron en medio SuperBroth a  $22^{\circ}\text{C}$  *overnight*, 2% de glucosa, 20 mM MgCl<sub>2</sub>. En los ensayos en grandes volúmenes, se mantuvieron las mismas condiciones de expresión de los ensayos a baja escala. Posteriormente se hizo una dilución 1:200 y cuando alcanzó la DO 0.5 se indujo con 0.3 mM de isopropil- $\beta$ -D-Thiogalactopiranosido (IPTG) por 12 hs.

### **2.3.4 Preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens***

La obtención de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 electrocompetentes se realizó de la siguiente manera: se inoculó 1 ml de agrobacterias provenientes de un cultivo saturado en 100 ml de medio YEB conteniendo rifampicina 20 $\mu$ g/ml y gentamicina 50  $\mu$ g/ml 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 a  $4^{\circ}\text{C}$  y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en glicerol 10 % estéril a  $4^{\circ}\text{C}$  en lavados sucesivos de 1; 0,5; 0,2 y 0,2 volúmenes del cultivo original. Finalmente, las bacterias fueron resuspendidas en 0,01 Vol. y se alícuotaron. Por último fueron conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **2.3.5 Transformación por electroporación de *Agrobacterium tumefaciens***

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

1. Capacitancia: 25  $\mu$ F
2. Voltaje: 2.5 KV
3. Resistencia: 200  $\Omega$



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

## **2.4 Manipulación de plantas-*A. thaliana*, *N. benthamiana* y *tabacum*-**

### **2.4.1 Mantenimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana***

Todas las plantas de *Arabidopsis thaliana* usadas en el presente trabajo pertenecen al ecotipo Columbia-0 (Col-0). Luego de la esterilización de las semillas se crecen en placas de MS (medio basal de Murashige and Skoog (MS) (4.4g/l) suplementado con 20g/l sacarosa, llevado a pH 5.8 con 1M KOH, y conteniendo 0.8% (w/v) de Agar y antibióticos de selección deseados). Las placas se incuban por 3-4 días a 4°C. Las condiciones de germinación eran de día largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad), 22°C y 50% de humedad relativa. Luego de 1-2 semanas de germinación, las semillas eran pasadas a macetas conteniendo compos:perlita 1:1 en invernadero.

### **2.4.2. Transformación de *Arabidopsis thaliana* por 'floral dip'**

Plantas de *Arabidopsis thaliana*, Col-0, de aproximadamente 4 semanas de edad fueron transformadas mediante el método de "Floral Dip" (Clough & Bent, 1998). Suscintamente, dos días antes de la transformación se inocularon 3 mL de medio LB (con los antibióticos anteriormente mencionados) que contenía las células de *A. tumefaciens* GV3101 que portaban el plásmido binario correspondiente. Este cultivo fue incubado hasta fase estacionaria a 28 °C en agitación constante (200 rpm) y fue luego transferido a 250 mL de LB que contenía los antibióticos de selección. El cultivo fue mantenido durante la noche en agitación constante (200 rpm) a 28 °C. El día de la transformación, se colectaron las células por centrifugación y se resuspendieron en 250 mL de medio de infiltración (2,5 gr de MES; 12,5 gr de sacarosa; 10 µL de Detergente Silwet L-77). Los brotes florales de las plantas fueron sumergidos en el medio de infiltración que contenía las bacterias durante 1 minuto. Luego, las plantas fueron cultivadas a 23 °C utilizando un ciclo de luz:oscuridad de 16 h:8 h durante aproximadamente 4 semanas (hasta que las silículas estuvieron secas) para obtener las semillas (To).

### **2.4.3 Identificación de las plantas transgénicas**

Las semillas cosechadas a partir de la To fueron esterilizadas según se describe en 2.3.5. Luego, se realizaron 3 lavados con agua miliQ estéril y se resuspendieron las semillas en 1,5 mL de TOP-agar (agar 0,1

% (P/V)). Las semillas fueron sembradas en placas de Petri que contenían MS diluido a la mitad solidificado con agar (0.8 % (P/V)), en presencia de kanamicina 50 µg/mL e incubadas por 48 horas a 4 °C en oscuridad, siendo luego llevadas al cuarto de cultivo (23°C y 16:8 h de luz/oscuridad). Tras la germinación se seleccionaron visualmente aquellas plantas que exhibieron resistencia a kanamicina. Después de la aparición del tercer par de hojas, las plantas se pasaron a macetas con tierra. Se evaluó entonces la presencia del transgén mediante la observación en raíces de fluorescencia roja con una LUPA UV Leica MZ10F con filtros GFP3 (excitación 470/40nm , emisión 525/50nm), GFP (excitación 425/60nm, emisión 480nm), YFP (excitación 510/20nm , emisión 560/40nm) y dsRed (excitación 545/30nm, emisión 620/60nm ) acoplada a una Cámara Digital DFC490.

#### **2.4.4 Mantenimiento de plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum***

Las plantas de *Nicotiana* usadas para los ensayos de agroinfiltración fueron *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana* SR1 y *Nicotiana benthamiana*. Las plantas fueron germinadas en almácigos conteniendo perlita:Resaca 1:3 embebidas con almacigol. Las plantas se mantuvieron bajo iluminación artificial (ciclo 12 hs luz/oscuridad) a temperatura constante de 26°C.

#### **2.4.5 Esterilización de semillas**

Las semillas fueron esterilizadas en tubos eppendorf de 1.5 ml. Las semillas fueron incubadas con 1 ml de etanol 70 % (V/V) durante 2 minutos en agitación, centrifugadas a 13000rpm y, luego, incubadas por 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio 5 % (V/V), SDS 0,1 % (V/V). Luego, se realizaron 3 lavados con agua miliQ estéril.

#### **2.4.6 Transformación de hojas de *Nicotiana benthamiana* y *tabacum* por Agroinfiltración**

Se cultiva un clon GV3101 de interés, en medio YEB + ATB (plasmido) + ATB (cepa) a 28°C a 200 rpm en oscuridad *overnight* hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 1.5-2. Se mide la DO a 600nm y se calcula la alícuota necesaria para una solución de medio de Infiltración (MI) de 4ml volumen final a una DO final de 0.1.

$$\text{Formula ( DO inicial x Vol. inicial= 4000ul x 0.1 DO final$$

Se centrifuga 1ml de cultivo a 13.000rpm x 1min y resuspende en 1ml de medio de Infiltración y realizan 2 lavados. Se prepara la alícuota de agrobacterium calculada para obtener una solución de infiltración de 4 ml a DOfinal: 0.1. Se agroinfiltra la cara abaxial de la hoja con una jeringa de 1ml sin aguja ejerciendo presión. Las co-expresiones se realizan mezclando los cultivos de interés previo a la agroinfiltración siempre a una DO final de 0,1. Por encima, de una DO de 0,1 se considera que se esa sobresaturando el sistema. Luego se observa al CLSM a las 72 hs (3-4día).

## 2.5 Microscopía confocal

La microscopía confocal es una técnica de imágenes que ofrece muchas ventajas comparadas a las microscopías convencionales, incluyendo un campo de profundidad controlable, la eliminación de información fuera de foco, entre otros.

En este trabajo, las muestras de tejidos provenientes de hojas agroinfiltradas o de expresión estable, raíces y embriones fueron examinados usando el microscopio confocal laser Leica DRM TCS SP5 AOBs. Estructuras subcelulares fueron visualizadas usando el objetivo de aceite 63x. Las proteínas reporteras fueron excitadas y detectadas en sus picos de excitación/emisión máximos como se describe en 1.7.

Para la visualización en hojas se obtuvieron recortes de 0,5cm x 0,5cm. Para la visualización de raíces, se eligieron plántulas jóvenes visualizándose la raíz entera sin realizar ningún corte. Para los embriones, la cáscara de la semilla se abrió con la ayuda de agujas y una lupa, separando al embrión. En todos los casos, se monto la muestra sobre un portaobjetos embebido en MS líquido diluido a la mitad, apoyo el cubreobjetos sin quedar cámaras de aire y se procedió a la visualización.

<b>Proteína Fluorescente</b>	<b>Máx Excitación (nm)</b>	<b>Máx. Emisión (nm)</b>
RFP	561	570–630
YFP	514	525–559
GFP	488	496–532

## 2.6 Técnicas de proteínas

### 2.6.1 Extracción proteica de E.coli

Una vez inducidos los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm por 30 minutos. El precipitado bacteriano se resuspendió en buffer de lisis (NaCl 300 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, Imidazol 10mM, ajustado a pH 8 usando NaOH) y se agregó lisozima 1 mg/ml e incubó en hielo por 30 minutos. Luego, se sonicó 6 veces durante 30 segundos, con intervalos de 1 min de descanso (sonicador Sonifier B-12 Brandson Sonic Power) y se centrifugó a 10,000 x g durante 20 minutos a 4°C. La fracción soluble clarificada fue recolectada y se procedió a una purificación en Batch o en suspensión según corresponde.

La purificación en Batch de la proteína recombinante con tag de histidinas fue realizada mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC de Qiagen) con níquel quelado, la cual consiste en agregar resina Ni<sup>2+</sup>-nitriloacetato de agarosa (Ni-NTA, siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAexpress Kit, Quiagen, Hilden, Alemania). Brevemente, se agregó 1ml de resina por cada 4 ml de lisado clarificado en un tubo de centrifuga. Se colocó en un agitador rotatorio a 400 rpm a 4 °C por 60 min. La

suspensión con la resina se transfirió a una columna y se recolectó el excluido o flow-through para análisis posteriores en SDS-PAGE. Se procedió a lavar las proteínas no unidas específicamente con el buffer de lavado (NaCl 300 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, Imidazol 20 mM, Tween 20 0,05%, pH = 8) y se midió la absorbancia a 280 nm hasta obtener una densidad óptica estable y cercana a cero. La proteína recombinante unida por afinidad se eluyó con el buffer de elución (NaCl 300 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, Imidazol 250 mM, 0,05% de Tween 20, a pH = 8) y las fracciones eluidas con absorbancia mayor a 0,05 se dializaron contra buffer HEPES 50 mM a pH 7,5 y la pureza de la proteína eluida fue visualizada por SDS-PAGE.

### **2.6.2 Extracción de proteínas totales desde hojas**

Para obtener las proteínas totales de hojas se molieron en N<sub>2</sub> líquido con mortero 10 discos de hojas (aproximadamente de 0.5cm<sup>2</sup> 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 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.

### **2.6.3 Obtención de Microsomas**

El protocolo utilizado para obtener la fracción microsomal de hojas de plantas transgénicas de Arabidopsis fue el siguiente:

1-200mg de hojas transgénicas expresando la proteína de interés fueron homogenizados con mortero en 1,5ml de buffer sacarosa (100 mM Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane]-HCl, pH 7.5, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, and 12% [w/w] Sacarosa)

2-El homogenato se centrifugó a 1000g por 5 min a 4°C para remover restos celulares y núcleos.

3-El sobrenadante (800µl) se sembró sobre un colchón de sacarosa 17%(w/w) y centrifugo por 30 min a 150,000g a 4°C en una ultracentrifuga (swinging bucket).

4-El sobrenadante contiene las proteínas citosólicas y vacuolares

5-El pellet, denominado pellet microsomal (MP), se resuspende en 3 ml de Buffer sacarosa. Luego 1ml se incuba con 4 ml de cada una de las siguientes soluciones: buffer sacarosa solo; buffer salino NaCl (para liberar proteínas unidas periféricamente del lado citosólico del microsoma); y un buffer alcalino (para liberar proteínas unidas fuertemente a la membrana pero que no son proteínas de membrana que se mantienen asociadas) (Fujiki et al. 1982), e incuba por 30 minutos en hielo.

6-Para analizar la interacción de la proteína de interés con la membrana luego de las incubaciones, la suspensión microsomal se sembró sobre un colchón de sacarosa 17% (w/w) y centrifugo por 30 min. a 150,000g.

7-Cuidadosamente se transfiere el sobrenadante a un Nuevo tubo (fracción S)

8- El pellet (fracción P) se resuspende en buffer de homogenización (100 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, y 1% (v/v) Triton X-100, pH 7.5, complementado con un cóctel de inhibidores de proteasas).

9- Las muestras se desnaturalizaron con Buffer Laemmli, y sembraron en un gel reductor de SDS-PAGE y transfirieron a una membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride) (Polyscreen®, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). Blot se incubó con un anticuerpo primario específico contra RFP de conejo (1:2000 dilution, Rabbit Polyclonal IgG, ABR) y luego un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa específico de IgG de conejo (1:2000 dilution, Sigma). La inmunodetección se realizó con el sistema de quimioluminiscencia (ECL-Amersham) siguiendo el protocolo de los fabricantes.

#### 2.6.4 Obtención de vacuolas

Plantas transgénicas para RFP-TMCT de *Arabidopsis thaliana* fueron crecidas en tierra, y se tomaron hojas de 5 semanas para aislar protoplastos con el método con cintas adhesiva sándwich y posterior digestión de la pared celular de las células de mesófilo (Wu y col. 2009) entre 20 y 60 minutos, hasta la observación de gran cantidad de protoplastos en solución por microscopia de campo claro invertido. Los protoplastos fueron lisados y las vacuolas liberadas fueron aisladas por ultracentrifugación en un gradiente de densidad con Ficoll siguiendo el protocolo de Robert y col. 2007. La fracción vacuolar fue examinada por inmunoblot indicando que no haya contaminación con otros componentes del sistema de endomembranas, con suero específico de BiP.

#### 2.6.5 SDS-PAGE

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

Composición de los geles:

Componentes del gel	Gel de corrida			Stacking (apilamiento)
	12%	13,50%	15%	
Acril/Bis 30%	4	4,5	5	0,8
Tris 1 M pH=8,8	3,75	3,75	3,75	0,625
SDS 20%	0,05	0,05	0,05	0,025
H2O	1,16	0,66	0,06	3,527
Glicerol	1	1	1	
Persulfato 10%	0,05	0,05	0,05	0,025
TEMED	0,006	0,006	0,006	0,005
Vol final	10	10	10	5

El TEMED se agregó en el momento previo a colocar el gel. Se mezcla por inmersión y se coloca entre los vidrios del gel. Para determinar cuando el gel ya polimerizó controlar con el resto de la preparación de los geles que no fue utilizada. Colocar el gel con pipeta pasteur. Esperar que polimerice el gel de corrida para

luego agregar el gel de apilamiento. Una vez agregado el gel de corrida llenar hasta el tope con H<sub>2</sub>O, luego tirar el agua y agregar el gel de apilamiento.

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.

#### **2.6.6 Western blot**

Transferencia: 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.

Confirmación de la transferencia-Tinción con Rojo *Ponceau*: La 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 H<sub>2</sub>O bidestilada estéril hasta decolorar el fondo.

Revelado: Las membranas se incubaron 1 hora a 37°C en solución de bloqueo 5% leche en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, leche descremada Molico). Las posteriores incubaciones con los anticuerpos primarios y secundarios se detallan en cada ensayo y aquí se ejemplifica la detección de RFP. 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 un anticuerpo anti-RFP de conejo RFP overnight (dilución 1:2000, Rabbit Polyclonal IgG, ABR). Seguido, se lavaron las membranas 3 veces, por 15 minutos cada vez, con solución de lavado TBS. Luego se incubó con el anticuerpo secundario específico de IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1:2000 dilution, Sigma). 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 usando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham).

### **2.6.7 ELISA**

La expresión del anticuerpo recombinante se detectó mediante ELISA de los lisados, detectando con anticuerpo anti-His-HRP para las construcciones en pComb3X, y anti-MBP-HRP para las construcciones en pMalPSS.

Para cuantificar el nivel de acumulación del anticuerpo en sus distintas versiones se utilizó el método de ELISA directo. En donde las fosas se sensibilizaron con una dilución (1:2) del extracto total de hojas co-agroinfiltradas con LC-FP y HC-FP (Sec-IgG-FP), LC-RFP y HC-FP-AFVY (IgG-FP-AFVY), LC-RFP y HC-FP-TMCT (Ig-FP-TMCT), y también con HcPro o p19 y un extracto total negativo no agroinfiltrado, en buffer de sensibilización a 4°C overnight. Se bloquearon los sitios de unión no específicos con solución de bloqueo (5% leche descremada en PBS) por 1 hora a 37°C. Seguido se realizaron tres lavados con PBS. Posteriormente se incubó a 4°C overnight con suero específico de inmunoglobulina G de ratón biotinilado (1:1000) en 1% leche descremada en PBS. Las placas se lavaron por 6 veces con PBS-T, y por último se incubaron con estreptavidina-HRP (1:3000) en 1% leche descremada en PBS a 4°C overnight. Las placas se lavaron por 6 veces con PBS-T y se reveló con el sustrato específico de peroxidasa, tetrametilbenzidina (TMB, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Luego se midió la densidad óptica a 650nm para seguir la reacción y la misma se frenó con el agregado de solución stop (HCl 1N) y midió la densidad óptica a 450nm.



# Bibliografía





---

---

**Bibliografía**

- Agardh, D., Dahlbom, I., Daniels, T., Löhrinc, E., Ivarsson, S. A., Lernmark, Å., et al. (2005). Autoantibodies against soluble and immobilized human recombinant tissue transglutaminase in children with celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 41(3), 322-327
- Aggarwal S (2011) What's fueling the biotech engine-2010 to 2011. *Nature Biotechnology* 29: 1083-1089
- Ahmed SU, Rojo E, Kovaleva V, Venkataraman S, Dombrowski JE, Matsuoka K, Raikhel NV (2000) The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH(2)-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Biol* 149: 1335-1344
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. Garland Science, New York
- Al-Sayyed B, Piperdi S, Yuan X, Li A, Besra GS, Jacobs Jr WR, Casadevall A, Glatman-Freedman A (2007) Monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* CDC 1551 reveal subcellular localization of MPT51. *Tuberculosis* 87: 489-497
- Arcalis E, Marcel S, Altmann F, Kolarich D, Drakakaki G, Fischer R, Christou P, Stoger E (2004) Unexpected Deposition Patterns of Recombinant Proteins in Post-Endoplasmic Reticulum Compartments of Wheat Endosperm. *Plant Physiology* 136: 3457-3466
- Bakker H, Bardor M, Molthoff JW, Gomord V, Elbers I, Stevens LH, Jordi W, Lommen A, Faye L, Lerouge P (2001) Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:2899-2904
- Bakker H, Rouwendal GJ, Karnoup AS, Florack DE, Stoopen GM, Helsper JP, et al. An antibody produced in tobacco expressing a hybrid beta-1,4-galactosyltransferase is essentially devoid of plant carbohydrate epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7577-82
- Barbas C, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Barbas CF 3rd, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7978-7982
- Barbi T, Drake PMW, Drever M, van Dolleweerd CJ, Porter AR, Ma JK (2011) Generation of transgenic plants expressing plasma membrane-bound antibodies to the environmental pollutant microcystin-LR. *Transgenic Research* 20: 701-707
- Barlow AK, Heckels JE, Clarke IN (1987) Molecular cloning and expression of *Neisseria meningitidis* class I outer membrane protein in *Escherichia coli* K-12. *Infection and Immunity* 55: 2734-2740
- Baulcombe D, Voinnet O, Hamilton A (2000) ENHANCED TRANSGENE EXPRESSION BY CO-EXPRESSION WITH A SUPPRESSOR OF POST-TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING (PTGS). In, EP 1232274 B1
- Baum TJ, Hiatt A, Parrott WA, Pratt LH, Hussey RS (1996) Expression in tobacco of a functional monoclonal antibody specific to stylet secretions of the root-knot nematode. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9: 382-387
- Bednarek SY, Wilkins TA, Dombrowski JA, Raikhel NV (1990) A carboxyl-terminal propeptide is necessary for proper sorting of barley lectin to vacuoles of tobacco. *Plant Cell* 2: 1145-1155
- Bednarek, S. Y., T. A. Wilkins, J. E. Dombrowski and N. V. Raikhel (1990). "A carboxyl-terminal propeptide is necessary for proper sorting of barley lectin to vacuoles of tobacco." *Plant Cell* 2(12): 1145-55
- Benchabane, M., Goulet, C., Rivard, D., Faye, L., Gomord, V., & Michaud, D. (2008). *Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories*. *Plant Biotechnology Journal* (pp. 633-648). doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00344.x
- Bethke P, Jones RL (2000) Vacuoles and prevacuolar compartments. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 469-475
- Bole, D.G., Hendershot, L.M., and Kearney, J.F. (1986). Posttranslational association of immunoglobulin heavy-chain binding-protein with nascent heavy-chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *J. Cell Biol.* 102, 1558-1566
- Bose, B., Khanna, N., Acharya, S. K., & Sinha, S. (2005). High affinity mouse-human chimeric Fab against Hepatitis B surface antigen. *Journal of Gastroenterology*, 11(48), 7569-7578

- Bosilevac JM, Gilchrist CA, Jankowski PE, Paul S, Rees AR, Hinrichs SH (1998) Inhibition of activating transcription factor 1- and cAMP-responsive element-binding protein-activated transcription by an intracellular single chain Fv fragment. *Journal of Biological Chemistry* 273: 16874-16879
- Boston, R.S., Viitanen, P.V. and Vierling, E. (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, 32, 191-222
- Boulafloous A, Saint-Jore-Dupas C, Herranz-Gordo MC, Pagny-Salehabadi S, Plasson C, Garidou F, Kiefer-Meyer MC, Ritzenthaler C, Faye L, Gomord V (2009) Cytosolic N-terminal arginine-based signals together with a luminal signal target a type II membrane protein to the plant ER. *BMC Plant Biology* 9
- Bouquin T, Thomsen M, Nielsen LK, Green TH, Mundy J, Dziegiel MH (2002) Human anti-Rhesus D IgG1 antibody produced in transgenic plants. *Transgenic Research* 11: 115-122
- Branden C and Tooze J (1991) *Introduction to Protein Structure*. Garland Publishing, New York, pp. 256-260
- Brandizzi F, Frangne N, Marc-Martin S, Hawes C, Neuhaus J-M, Paris N (2002) The Destination for Single-Pass Membrane Proteins Is Influenced Markedly by the Length of the Hydrophobic Domain. *PLANT CELL* 14: 1077-1092
- Brandizzi F, Snapp E, Roberts A, Lippincott-Schwartz J and Hawes C (2002) Membrane protein transport between the ER and Golgi in Tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independence: evidence from selective photobleaching. *Plant Cell* 14:1293-1309
- Briggs K, Zeitlin L, Wang F, Chen L, Fitchen J, Glynn J, Lee VD, Zhang S, Whaley K (2000) Anti-HSV antibodies produced in rice plants protect mice from vaginal HSV infection. *Plant Biol.*
- Brodzik, R., Glogowska, M., Bandurska, K., Okulicz, M., Deka, D., Ko, K., van der Linden, J., Leusen, J.H.W., Pogrebnyak, N., Golovkin, M., Steplewski, Z. and Koprowski, H. (2006) Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103, 8804–8809
- Canizares, M.C., Liu, L., Perrin, Y., Tsakiris, E. and Lomonosoff, G.P. (2006) A bipartite system for the constitutive and inducible expression of high levels of foreign proteins in plants. *Plant Biotechnol. J.*, 4, 183–193
- Cao X, Rogers SW, Butler J, Beevers L, Rogers JC (2000) Structural requirements for ligand binding by a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Cell* 12: 493-506
- Cao X, Rogers SW, Butler J, Beevers L, Rogers JC (2000) Structural requirements for ligand binding by a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Cell* 12: 493-506.
- Capodicasa, C., Chiani, P., Bromuro, C., De Bernardis, F., Catellani, M., Palma, A. S., et al. (2011). Plant production of anti- $\beta$ -glucan antibodies for immunotherapy of fungal infections in humans. *Plant Biotechnology Journal*, 9(7), 776-787
- Carrington JC, Freed DD, Leinicke AJ (1991) Bipartite signal sequence mediates nuclear translocation of the plant polyviral N1a protein. *Plant Cell* 3:953-962
- Casadevall A, Cleare W, Feldmesser M, Glatman-Freedman A, Goldman DL, Kozel TR, Lendvai N, Mukherjee J, Pirofski LA, Rivera J, Rosas AL, Scharff MD, Valadon P, Westin K, Zhong Z (1998) Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1437-1446
- Castilho A, Strasser R, Stadlmann J, Grass J, Jez J, Gattinger P, Kunert R, Quendler H, Pabst M, Leonard R, Altmann F, Steinkellner H (2010) In Planta protein sialylation through overexpression of the respective mammalian pathway. *Journal of Biological Chemistry* 285: 15923-15930
- Cheung JCN., & Tong, A. P. C. Y. (2009). Expression and subcellular targeting of human insulin-like growth factor binding protein-3 in transgenic tobacco plants. *Transgenic Research*, 943-951. doi:10.1007/s11248-009-9286-8
- Chirido FG, Fossati CA, Añon MC (1998) Development of high-sensitive enzyme immunoassays for gliadin quantification using the streptavidin-biotin amplification system. *Food and Agricultural Immunology* 10: 143-155
- Chon JH, Zarbis-Papastoitsis G (2012) Advances in the production and downstream processing of antibodies. *New Biotechnology* 28: 458-463
- Chothia C, Finkelstein AV (1990) The Classification and Origins of Protein Folding Patterns. 59: 1007-1039.
- Chothia C, Lesk AM (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *Journal of Molecular Biology* 196: 901-917

- Ciccia G (2011) Consortium for Research, Development & Innovation Partnership Models In Workshop "Bottlenecks in the Establishment of Biotech-Based Companies" Fundación Leloir, Buenos Aires, 7 de octubre
- Circelli P, Donini M, Villani ME, Benvenuto E, Marusic C (2010) Efficient Agrobacterium-based transient expression system for the production of biopharmaceuticals in plants. *Bioengineered Bugs* 1: 221-224
- Circelli, P., Donini, M., Villani, M. E., Benvenuto, E., & Marusic, C. (2010). for the production of biopharmaceuticals in plants, (June), 221-224. doi:10.1186/1472-6750-9-96.e
- Coffino, P., Laskov, R., and Scharff, M.D. (1970). Immunoglobulin production: method for quantitatively detecting variant myeloma cells. *Science* 167, 186– 188
- Contreras I, Ortiz-Zapater E, Aniento F (2004) Sorting signals in the cytosolic tail of membrane proteins involved in the interaction with plant ARF1 and coatomer. *Plant Journal* 38: 685-698
- Cox KM, Sterling JD, Regan JT, Gasdaska JR, Frantz KK, Peele CG, Black A, Passmore D, Moldovan-Loomis C, Srinivasan M, Cuisson S, Cardarelli PM, Dickey LF (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
- Crofts AJ, Leborgne-Castel N, Hillmer S, Robinson DG, Phillipson B, Carlsson LE, Ashford DA, and Denecke J. (1999) Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde bulk flow. *Plant Cell*. 11:2233–2248
- Daniela C., & Petruccielli, D. S. (2010). Tesis de Licenciatura. Construcción y expresión de una proteína de fusión C-terminal entre la cadena kappa del anticuerpo 14D9 y una proteína fluorescente roja. Tesina de Licenciatura, UNLP.
- daSilva LL, Taylor JP, Hadlington JL, Hanton SL, Snowden CJ, Fox SJ, Foresti O, Brandizzi F, Denecke J (2005) Receptor salvage from the prevacuolar compartment is essential for efficient vacuolar protein targeting. *Plant Cell* 17:132–148
- daSilva LLP, Foresti O, Denecke J (2006) Targeting of the plant vacuolar sorting receptor BP80 is dependent on multiple sorting signals in the cytosolic tail. *Plant Cell* 18(6):1477–1497
- De Jesus M, Nicola AM, Frases S, Lee IR, Mieses S, Casadevall A (2009) Galactoxylomannan-mediated immunological paralysis results from specific B cell depletion in the context of widespread immune system damage. *Journal of Immunology* 183: 3885-3894
- De Jesus M, Wurm FM (2011) Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78: 184-188
- De Muyneck, B., Navarre, C., Nizet, Y., Stadlmann, J. and Boutry, M. (2009) Different subcellular localization and glycosylation for a functional antibody expressed in *Nicotiana tabacum* plants and suspension cells. *Transgenic Res.*, 18, 467–482
- De Neve M, De Loose M, Jacobs A, Van Houdt H, Kaluza B, Weidle U, Van Montagu M, Depicker A (1993) Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Res* 2: 227-237
- De Wilde C, De Neve M, De Rycke R, Bruyns AM, De Jaeger G, Van Montagu M, Depicker A, Engler G (1996) Intact antigen-binding MAK33 antibody and Fab fragment accumulate in intercellular spaces of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 114: 233-241
- De Wilde, C., De Neve, M., De Rycke, R., Bruyns, A.M., De Jaeger, G., Van Montagu, M., Depicker, A. and Engler, G. (1996) Intact antigen-binding MAK33 antibody and F-ab fragment accumulate in intercellular spaces of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.*, 114, 233–241
- De Wilde, C., Peeters, K., Jacobs, A., Peck, I. and Depicker, A. (2002) Expression of antibodies and Fab fragments in transgenic potato plants: a case study for bulk production in crop plants. *Mol. Breed*, 9, 271–282
- Decker, E.L. and Reski, R. (2008) Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 31, 3–9
- Denecke J, Botterman J, Deblaere R (1990) Protein Secretion in Plant Cells Can Occur via a Default Pathway. *The Plant Cell* 2: 51-59

- Di Niro R, Ferrara F, Not T, Bradbury ARM, Chirido F, Marzari R, Sblattero D (2005) Characterizing monoclonal antibody epitopes by filtered gene fragment phage display. *Biochemical Journal* 388: 889-894
- Di Sansebastiano GP, Paris N, Marc-Martin S, Neuhaus JM (1998) Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway. *Plant J* 15: 449-457
- Dombrowski JE, Schroeder MR, Bednarek SY, Raikhel NV (1993) Determination of the functional elements within the vacuolar targeting signal of barley lectin. *Plant Cell* 5: 587-596
- Doran MP (2006) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnol* 24:426-432. doi:10.1016/j.tibtech.2006.06.012
- Doran PM. Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol* 2000;11:199-204
- Drake PMW, Barbi T, Drever MR, van Dolleweerd CJ, Porter AJR, Ma JKC (2010) Generation of transgenic plants expressing antibodies to the environmental pollutant microcystin-LR. *The FASEB Journal* 24: 882-890
- Drake, P.M.W., Chargelegue, D.M., Vine, N.D., van Dolleweerd, CJ, Obregon P and Ma JKC (2003) Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. *Plant Mol. Biol.*, 52, 233-241
- Duan L, Zhang H, Oakes JW, Bagasra O, Pomerantz RJ (1994) Molecular and virological effects of intracellular anti-Rev single-chain variable fragments on the expression of various human immunodeficiency virus-1 strains. *Human Gene Therapy* 5: 1315-1324
- During, K., Hippe, S., Kreuzaler, F. and Schell, J. (1990) Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.*, 15, 281-293.
- Ehrenmann F, Giudicelli V, Duroux P, Lefranc M-. IMGT/collier de perles: IMGT standardized representation of domains (IG, TR, and IgSF variable and constant domains, MH and MhSF groove domains). *Cold Spring Harbor Protocols* [Internet]. 2011;6(6):726-36
- Ehrenmann F, Giudicelli V, Duroux P, Lefranc M-P (2011) IMGT/Collier de Perles: IMGT Standardized Representation of Domains (IG, TR, and IgSF Variable and Constant Domains, MH and MhSF Groove Domains). *Cold Spring Harbor Protocols* 2011: pdb.prot5635
- Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M-P (2010) IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhSF. *Nucleic Acids Research* 38: D301-307
- Ehrenmann F, Lefranc M-P (2011) IMGT/3Dstructure-DB: Querying the IMGT Database for 3D Structures in Immunology and Immunoinformatics (IG or Antibodies, TR, MH, RPI, and FPIA). *Cold Spring Harbor Protocols* 2011: pdb.prot5637
- Ehrenmann, F., Q. Kaas, M.P. Lefranc (2010). IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhSF. *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue):D301-D307. doi:10.1093/nar/gkp946
- Elkabetz, Y., Argon, Y., and Bar-Nun, S. (2005). Cysteines in CH1 underlie retention of unassembled Ig heavy chains. *J. Biol. Chem.* 280, 14402-14412
- Engberg J, Andersen PS, Nielsen LK, Dziegiel M, Johansen LK, Albrechtsen B (1996) Phage-Display Libraries of Murine and Human Antibody Fab Fragments. In S Paul, ed, *Methods in Molecular Biology: Antibody Engineering Protocols*, Vol 51. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp 355-376
- Ewert S, Honegger A, Plückthun A (2003) Structure-based improvement of the biophysical properties of immunoglobulin VH domains with a generalizable approach. *Biochemistry* 42: 1517-1528
- Ewert S, Honegger A, Plückthun A (2004) Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods* 34: 184-199
- Feige, M. J., Groscurth, S., Marcinowski, M., Shimizu, Y., Kessler, H., & Hendershot, L. M. (2009). Article An Unfolded C H 1 Domain Controls the Assembly and Secretion of IgG Antibodies. *Molecular Cell*, 34(5), 569-579. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.028
- Feizi T. (1993). Oligosaccharides that mediate cell-cell adhesion. *Curr Opin Struct Biol* 3:701-710
- Fernández, M. L., Vivas, S., Ruiz De Morales, J. M., & Marugán, J. M. (2005). Usefulness of anti-transglutaminase antibodies in the diagnosis of celiac disease. [Utilidad de los anticuerpos

- antitransglutaminasa en el diagnóstico de la enfermedad celíaca] *Gastroenterología y Hepatología*, 28(8), 437-440
- Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Twyman RM. (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* 7:152–158
- Fischer, R., Liao, Y.C. and Drossard, J. (1999) Affinity-purification of a TMV-specific recombinant full-size antibody from a transgenic tobacco suspension culture. *J. Immunol. Methods*, 226, 1–10
- Fischer, R., Schillberg, S., Hellwig, S., Twyman, R. M., & Drossard, J. (2011). GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnology advances*, 6-11. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.007
- Fitchette, A.C., Cabanes-Macheteau, M., Marvin, L., Martin, B., Satiat-Jeunemaitre, B., Gomord, V., Crooks, K., Lerouge, P., and Faye, L. (1999). Biosynthesis and immunolocalization of Lewis a-containing N-glycans in the plant cell. *Plant Physiol.* 121, 333–344
- Floss DM, Sack M, Arcalis E, Stadlmann J, Quendler H, Rademacher T, Stoger E, Scheller J, Fischer R, Conrad U (2009) Influence of elastin-like peptide fusions on the quantity and quality of a tobacco-derived human immunodeficiency virus-neutralizing antibody. *Plant Biotechnology Journal* 7: 899-913
- Floss, D.M., Sack, M., Stadlmann, J., Rademacher, T., Scheller, J., Stoger, E., Fischer, R. and Conrad, U. (2008) Biochemical and functional characterization of anti-HIV antibody-ELP fusion proteins from transgenic plants. *Plant Biotechnol. J.*, 6, 379– 391
- Foresti O, Frigerio L, Holkeri H, de Virgilio M, Vavassori S, Vitale A (2003) A Phaseolin Domain Involved Directly in Trimer Assembly Is a Determinant for Binding by the Chaperone BiP. *PLANT CELL* 15: 2464-2475
- Franklin, S.E. and Mayfield, S.P. (2005) Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 5, 225–235
- Freedman RB., Hirst TR., Tuite MF. (1989). Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci* 19:331-336
- Frigerio L, de Virgilio M, Prada A, Faoro F and Vitale A (1998) Sorting of phaseolin to the vacuole is saturable and requires a short C-terminal peptide. *Plant Cell* 10:1031–1042
- Frigerio L, Foresti O, Hernández Felipe D, Neuhaus JM, Vitale A (2001) The C-terminal tetrapeptide of phaseolin is sufficient to target green fluorescent protein to the vacuole. *J. Plant Physiol.* 158: 499-503.
- Frigerio L, Pastres A, Prada A, Vitale A (2001) Influence of KDEL on the Fate of Trimeric or Assembly-Defective Phaseolin: Selective Use of an Alternative Route to Vacuoles. *PLANT CELL* 13: 1109-1042
- Frigerio, L., Vine, N. D., Pedrazzini, E., Hein, M. B., Wang, F., Ma, J. K., & Vitale, A. (2000). Assembly, Secretion, and Vacuolar Delivery of a Hybrid Immunoglobulin in Plants. *Society*, 123(August), 1483-1493
- Fujiwara T, Hirai MY, Chino M, Komeda Y and Naito S (1992) Effects of sulfur nutrition on expression of the soybean seed storage protein genes in transgenic petunia. *Plant Physiol.*, 99, 263–268
- Fujiyama, K., et al. (2006). "In Planta production of immunogenic poliovirus peptide using tobacco mosaic virus-based vector system." *J Biosci Bioeng* 101(5): 398-402
- Gattolin S, Sorieul M, Frigerio L (2010) Tonoplast intrinsic proteins and vacuolar identity. *Biochemical Society Transactions* 38: 769-773
- Gelvin, S.B.W.L. (IN), Hauptmann, R. (Davis, CA), Ni, M. (Albany, CA) and Cui, D. (Shandong, CN). (1999) Chimeric regulatory regions and gene cassettes for expression of genes in plants (United States: Biotechnology Research And Development Corporation (Peoria, IL), Purdue Research Foundation (West Lafayette, IN).
- Girard, L.S., Fabis, M.J., Bastin, M., Courtois, D., Petiard, V. and Koprowski, H. (2006) Expression of a human anti-rabies virus monoclonal antibody in tobacco cell culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345, 602–607
- Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., van Eldik, G., Botterman, J., Klimyuk, V. and Gleba, Y. (2006) Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103, 14701–14706

- Giudicelli V, Chaume D, Lefranc M-. IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2004;32(WEB SERVER ISS.):W435-40
- Gomord V, Fitchette AC, Menu-Bouaouiche L, Saint-Jore-Dupas C, Plasson C, Michaud D, et al. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnol J* 2010;8:564–87
- Gomord V, Sourrouille C, Fitchette A, Bardor M, Pagny S, Lerouge P and Faye L (2004) Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnology Journal* 2:83-100
- Gomord W, Chamberlain P, Jefferis R, Faye L (2005). Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol* 23:559–65
- 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
- Goulet, C., Khalf, M., Sainsbury, F., D'Aoust, M.-A. and Michaud, D. (2012), A protease activity-depleted environment for heterologous proteins migrating towards the leaf cell apoplast. *Plant Biotechnology Journal*, 10: 83–94. doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00643.x
- Haas AK, Von Schwerin C, Matscheko D, Brinkmann U (2010) Fluorescent Citrine-IgG fusion proteins produced in mammalian cells. *mAbs* 2: 648-661
- Hadlington, J. L. and J. Denecke (2000). "Sorting of soluble proteins in the secretory pathway of plants." *Curr. Opin. Plant Biol.* 3(6): 461-468
- Hamdy N, Goustin AS, Desaulniers JP, Li M, Chow CS, Al-Katib A (2005) Sheep red blood cells armed with anti-CD20 single-chain variable fragments (scFvs) fused to a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor: a strategy to target CD20-positive tumor cells. *J Immunol Methods* 297: 109-124
- Hara, J. M. O., Whaley, K., Pauly, M., Zeitlin, L., & Mantis, N. J. (2012). Plant-based expression of a partially humanized neutralizing monoclonal IgG directed against an immunodominant epitope on the ricin toxin A subunit. *Vaccine*, 30(7), 1239-1243. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.058
- 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*. 10:825–836
- Hassan AM., Wesson C., Trumble WR. (1995). Calreticulin is the major Ca<sup>2+</sup> storage protein in the endoplasmic reticulum of the pea plant (*Pisum sativum*). *Plant Physiol* 221:54-59
- Helenius, A. and M. Aebi (2004). "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum." *Annu Rev Biochem* 73: 1019-49
- Hempel, F., Bozarth, A.S., Lindenkamp, N., Klingl, A., Zauner, S., Linne, U., Steinbüchel, A., Maier, UG (2011) Microalgae as bioreactors for bioplastic production. *Microbial Cell Factories* 10 (81)
- Hendershot, L., Bole, D., Kohler, G., and Kearney, J.F. (1987). Assembly and secretion of heavy-chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy-chain binding-protein. *J. Cell Biol.* 104, 761–767
- Henry S., Oriol R., Samuelson B. (1995). Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang* 6:166-182
- Herman EM, Larkins BA (1999) Protein Storage Bodies and Vacuoles. *Plant Cell* 11: 601-614
- Hiatt, A., Cafferkey, R. and Bowdish, K. (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342, 76–78
- Hillmer S, Movafeghi A, Robinson DG, 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, Colanesi S, Hillmer S, Rogers JC & Robinson DG (2007) Localization of vacuolar transport receptors and cargo proteins in the Golgi apparatus of developing Arabidopsis embryos. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 8(10), 1452-64. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00625.x
- Hoh B, Hinz G, Jeong BK and Robinson DG (1995) Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. *J. Cell Sci.* 108, 299–310
- Holkeri H and Vitale A (2001) *Traffic* 2: 737–741

- Holwerda, B. C., H. S. Padgett and J. C. Rogers (1992) Proaleurain Vacuolar Targeting Is Mediated by Short Contiguous Peptide Interactions. *Plant Cell* 4(3): 307-318
- Honegger A, Malebranche AD, Rathlisberger D, Pluckthun A (2009) The influence of the framework core residues on the biophysical properties of immunoglobulin heavy chain variable domains. *Protein Engineering, Design and Selection* 22: 121-134
- Hong, S.Y., Kim, T.G., Kwon, T.H., Jang, Y.S. and Yang, M.S. (2007) Production of an anti-mouse MHC class II monoclonal antibody with biological activity in transgenic tobacco. *Protein Expr. Purif.*, 54, 134–138
- Hoogenboom HR (2002) Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 178: 1-37
- Horn U, Strittmatter W, Krebber A, Knapfer U, Kujau M, Wenderoth R, MÄ¼ller K, Matzku S, Pluckthun A, Riesenberg D (1996) High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46: 524-532
- 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, Phoolcharoen W, Lai H, Piensook K, Cardineau G, et al. High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replication system (2010) *Biotechnol Bioeng* 106:9-17
- Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P.M., Matsushima, M., and Palm, W. (1976). Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature* 264, 415–420
- Hull, A.K., Criscuolo, C.J., Mett, V., Groen, H., Steeman, W., Westra, H., Chapman, G., Legutki, B., Baillie, L. and Yusibov, V. (2005) Human-derived, plant-produced monoclonal antibody for the treatment of anthrax. *Vaccine*, 23, 2082–2086
- Hunter, P. R., Craddock, C. P., Benedetto, D., S., R., L.m, & Frigerio, L. (2007). Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol.*, 145, 1371-1382
- Irons SL, Nuttall J, FloÄ DM, Frigerio L, Kotzer AM, Hawes C (2008) Fluorescent protein fusions to a human immunodeficiency virus monoclonal antibody reveal its intracellular transport through the plant endomembrane system. *Plant Biotechnology Journal* 6: 649-662
- Jiang L, Phillips TE, Hamm CA, Drozdowicz YM, Rea PA, Maeshima M, Rogers SW, Rogers JC (2001) The protein storage vacuole: a unique compound organelle. *J. Cell Biol.* 155: 991-1002
- Jiang L, Phillips TE, Rogers SW, Rogers JC (2000) Biogenesis of the Protein Storage Vacuole Crystalloid. *J. Cell Biol.* 150: 755-769
- Jiang L, Rogers JC (1998) Integral Membrane Protein Sorting to Vacuoles in Plant Cells: Evidence for Two Pathways. *J. Cell Biol.* 143: 1183-
- Jiang L, Rogers JC (1999) Sorting of membrane proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Science* 146: 55-67
- Johnson LM, Bankaitis VA, and Emr SD (1987) *Cell* 48,875-885
- Jolliffe NA, Ceriotti A, Frigerio L, Roberts LM (2003) The position of the proricin vacuolar targeting signal is functionally important. *Plant Mol Biol* 51: 631–641
- Jolliffe NA, Craddock CP, & Frigerio L (2005) Pathways for protein transport to seed storage vacuoles. *Biochemical Society Transactions*, 33, 1016-1018
- Jurgens G (2004) Membrane trafficking in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 481–504
- Kaas Q, Ehrenmann F, Lefranc M-P (2007) IG, TR and IgSF, MHC and MhcSF: what do we learn from the IMGT Colliers de Perles? *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 6: 253-264
- Kaas Q, Ruiz M, Lefranc M-. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/StructuralQuery, a database and a tool for immunoglobulin, T cell receptor and MHC structural data. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2004;32(DATABASE ISS.):D208-10
- Kaas Q, Ruiz M, Lefranc M-P (2004) IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/StructuralQuery, a database and a tool for immunoglobulin, T cell receptor and MHC structural data. *Nucleic Acids Research* 32: D208-210
- Kagler M, Stein C, Schwenkert M, Saul D, Vockentanz L, Huber T, Wetzel SK, Scholz O, Pluckthun A, Honegger A, Fey GH (2009) Stabilization and humanization of a single-chain Fv antibody fragment

- specific for human lymphocyte antigen CD19 by designed point mutations and CDR-grafting onto a human framework. *Protein Engineering, Design and Selection* 22: 135-147
- Kaiser J (2008) Is the drought over for pharming. *Science* 320: 473-475
- Kathuria S, Sriraman R, Nath R, Sack M, Pal R, Artsaenko O, Talwar GP, Fischer R, Finnern R (2002a) Efficacy of plant-produced recombinant antibodies against HCG. *Hum. Reprod.* 17: 2054-2061
- Kathuria, S.R., Nath, R., Pal, R., Singh, O., Fischer, R., Lohiya, N.K. and Talwar, G.P. (2002b) Functional recombinant antibodies against human chorionic gonadotropin expressed in plants. *Curr. Sci.*, 82, 1452–1457
- Kawaguchi R, Bailey-Serres J. Regulation of translational initiation in plants (2002) *Curr Opin Plant Biol* 5:460–5
- Kay R, Chan A, Daly M and McPherson J (1987) Duplication of camv-35s promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*, 236, 1299–1302
- Khoudi H, Laberge S, Ferullo JM, Bazin R, Darveau A, Castonguay Y, Allard G, Lemieux R, VÃ©zina LP (1999) Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnology and Bioengineering* 64: 135-143
- Kim SJ, Park Y, Hong HJ (2005) Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Molecules and Cells* 20: 17-29
- Kindt TJ, Goldsby RA and Osborne, BA (2007) *Inmunología de Kuby* (6ª Ed.). Editorial McGraw Hill 2007
- Kirsch T, Paris N, Butler JM, Beevers L, Rogers JC (1994) Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 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
- Klionsky DJ, Banta LM and Emr SD 1988) *Mol. Cell. Biol.* (8) 2105-2116
- Knappik A, Pluckthun A (1995) Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Engineering* 8: 81-89
- Ko, K., Steplewski, Z., Glogowska, M. and Koprowski, H. (2005) Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102, 7026–7030
- 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
- Koide Y, Hirano H, Matsuoka K, Nakamura K (1997) The N-terminal propeptide of the precursor to sporamin acts as a vacuole-targeting signal even at the C-terminus of the mature part in tobacco cells. *Plant Physiology* 114: 863–870
- Komarnytsky S, Borisjuk N, Yakoby N, Garvey A, Raskin I (2006) Cosecretion of protease inhibitor stabilizes antibodies produced by plant roots. *Plant Physiology* 141: 1185-1193
- Komarova TV, Kosorukov VS, Frolova OY, Petrunia IV, Skrypnik KA, Gleba YY, Dorokhov YL (2011) Plant-made trastuzumab (Herceptin) inhibits HER2/Neu+ cell proliferation and retards tumor growth. *PLoS ONE* 6
- Koohapitagtam M, Rungpragayphan S, Hongprayoon R, Kositratana W, Sirinarumitr T (2010) Efficient amplification of light and heavy chain variable regions and construction of a non-immune phage scFv library. *Molecular Biology Reports* 37: 1677-1683
- Kornfeld S (1987) Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J.* (1) 462–468
- Kornfeld S (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate /insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 61: 307-330
- Korth KL and Dixon RA (1997) Evidence for chewing insect- specific molecular events distinct from a general wound response in leaves. *Plant Physiol.*, 115, 1299–1305
- Kügler M, Stein C, Schwenkert M, Saul D, Vockentanz L, Huber T, Wetzel SK, Scholz O, Plückthun A, Honegger A, Fey GH (2009) Stabilization and humanization of a single-chain Fv antibody fragment specific for human lymphocyte antigen CD19 by designed point mutations and CDR-grafting onto a human framework. *Protein Engineering, Design and Selection* 22: 135-147
- 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
- Lai HF, Engle M, Fuchs A, Keller T, Johnson S, Gorlatov S (2010) Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2419–24
- Lai, H., He, J., Engle, M., Diamond, M. S., & Chen, Q. (2012). Robust production of virus-like particles and monoclonal antibodies with geminiviral replicon vectors in lettuce. *Plant Biotechnology Journal*, 95-104. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00649.x
- Langedijk AC, Honegger A, Maat J, Planta RJ, Van Schaik RC, PiÅ¼ckthun A (1998) The nature of antibody heavy chain residue H6 strongly influences the stability of a V(H) domain lacking the disulfide bridge. *Journal of Molecular Biology* 283: 95-110
- Le Borgne R., Alconada A., Bauer U., and Hoflack B. (1998). The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins, *J. Biol. Chem.* 273: 29451-29461
- Lefranc M-, Pommié C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E, Truong L, Thouvenin-Contet V, Lefranc G. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and ig superfamily V-like domains. *Dev Comp Immunol [Internet]*. 2003;27(1):55-77
- Lefranc M-. IMGT collier de perles for the variable (V), constant (C), and groove (G) domains of IG, TR, MH, IgSF, and MhSF. *Cold Spring Harbor Protocols [Internet]*. 2011;6(6):643-51.
- Lefranc M-P (2003) IMGT, the international ImMunoGeneTics database(R). *Nucleic Acids Research* 31: 307-310
- Lefranc M-P, Giudicelli V, Ginestoux C, Jabado-Michaloud J, Folch G, Bellahcene F, Wu Y, Gemrot E, Brochet X, Lane J, Regnier L, Ehrenmann F, Lefranc G, Duroux P (2009) IMGT(R), the international ImMunoGeneTics information system(R). *Nucleic Acids Research* 37: D1006-1012
- Lefranc M-P, Giudicelli V, Kaas Q, Duprat E, Jabado-Michaloud J, Scaviner D, Ginestoux C, Clement O, Chaume D, Lefranc G (2005) IMGT, the international ImMunoGeneTics information system(R). *Nucleic Acids Research* 33: D593-597
- 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
- Li Y-B, Rogers SW, Tse YC, Lo SW, Sun SSM, Jauh G-Y, Jiang L (2002) BP-80 and Homologs are Concentrated on Post-Golgi, Probable Lytic Prevacuolar Compartments. *Plant Cell Physiol.* 43: 726-736
- Liebming E, et al (2009) Class I alpha-mannosidases are required for N-glycan processing and root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 21, 3850–3867.
- Lis H. and Sharon N. (1993). Protein glycosylation structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 218:1-27.
- Lombardi R, Villani M, Di Carli M, Brunetti P, Benvenuto E, Donini M. Optimisation of the purification process of a tumour-targeting antibody produced in *N. benthamiana* using vacuum-agroinfiltration. *Transgenic Res* 2010;19:1083–97
- Lu J, Sivamani E, Azhakanandam K, Samadder P, Li X, Qu R. Gene expression enhancement mediated by the 5' UTR intron of the rice *rub13* gene varied remarkably among tissues in transgenic rice plants. *Mol Genet Genomics* 2008;279:563–72
- Ma JKC, Drake P, Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 4:794–805
- Ma Y & Hendershot LM (2003) ER chaperone functions during normal and stress conditions. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 28(1-2), 51-65
- Ma, J.K.C., Lehner, T., Stabila, P., Fux, C.I. and Hiatt, A. (1994) Assembly of monoclonal-antibodies with IgG1 and Iga heavy- chain domains in transgenic tobacco plants. *Eur. J. Immunol.*, 24, 131–138.
- Mahon P & Bateman A (2000) The PA domain: a pro- tease-associated domain. *Protein Sci* 9, 1930–1934
- Mangano S, Gonzalez C, Petrucci S. (2011) Construction of a reporter system to study factors affecting the synthesis of full length immunoglobulins in plant cells. *Congreso PBVA2011*.
- Marcatili P, Rosi A, Tramontano A (2008) PIGS: automatic prediction of antibody structures. *Bioinformatics* 24: 1953-1954
- Marty F (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell* 11: 587–600

- Maruyama N, Mun LC, Tatsuhara M, Sawada M, Ishimoto M and Utsumi S (2006) Multiple Vacuolar Sorting Determinants exist in soybean 11S globulin. *Plant Cell* 18(5): 1253- 1273
- Marx U, Embleton MJ, Fischer R, Gruber FP, Hansson U, Heuer J, De Leeuw WA, Logtenberg T, Merz W, Portetelle D, Remette JL, Straughan DW (1997) Monoclonal Antibody Production: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 23. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals* 25: 121-137
- Masclaux FG, Galaud JP, Pont-Lezica R (2005) The riddle of the plant vacuolar sorting receptors. *Protoplasma* 226: 103–108
- Matsuoka K and Neuhaus JM (1999) Cis-elements of protein transport to the plant vacuoles. *J. Exp. Bot.* 50, 165–174
- Matsuoka K, Matsumoto S, Hattori T, Machida Y and Nakamura K (1990) Vacuolar targeting and post-translational processing of the precursor to the sweet potato tuberous root storage protein in heterologous plant cells. *J. Biol. Chem.* 265:19750–19757
- Mayer, M., Kies, U., Kammermeier, R., and Buchner, J. (2000). BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies in vitro. *J. Biol. Chem.* 275, 29421–29425
- McLean, M.D., Almquist, K.C., Niu, Y.F., Kimmel, R., Lai, Z.Z., Schreiber, J.R. and Hall, J.C. (2007) A human anti-*Pseudomonas aeruginosa* serotype O6ad immunoglobulin G1 expressed in Transgenic tobacco is capable of recruiting immune system effector function in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 3322–3328
- Melchers, F. (1971). The secretion of a Bence-Jones type light chain from a mouse plasmacytoma. *Eur. J. Immunol.* 1, 330–335
- Mendoza O, Valdés R, González M, Alemán R, Álvarez T, Padilla S, Tamayo A (2005). Influence of the number of animals on the production of monoclonal antibody CB.Hep-1 by the Ascites method. *Laboratory Animal Science*, 37(1)
- Menegazzi P., Guzzo F., Baldan B., Mariani P., Treves S. (1993). Purification of calreticulin- like protein(s) from spinach leaves. *Biochem Biophys Res Comm* 190:1130-1135
- Miao Y, Yan PK, Kim H, Hwang I, Jiang L (2006) Localization of Green Fluorescent Protein Fusions with the Seven Arabidopsis Vacuolar Sorting Receptors to Prevacuolar Compartments in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Physiol.* 142: 945-962
- Misaki, R., Sakai, Y., Omasa, T., Fujiyama, K., & Seki, T. (2011). N-terminal vacuolar sorting signal at the mouse antibody alters the N-linked glycosylation pattern in suspension-cultured tobacco BY2 cells. *JBIOSC*, 112(5), 476-484. The Society for Biotechnology, Japan. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.07.002
- Molina M, Otegui M, Petrucci 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: 302-306
- Mori T, Maruyama N, Nishizawa K, Higasa T, Yagasaki K, Ishimoto M, Utsumi S (2004) The composition of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum determines the transport pathways of soybean seed storage proteins. *Plant J* 40: 238-249
- Munro TP, Mahler SM, Huang EP, Chin DY, Gray PP (2011) Bridging the gap: Facilities and technologies for development of early stage therapeutic mAb candidates. *mAbs* 3: 440-452
- Muntz, K. (1998) Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology*, 38, 77-99
- Muynck, D., B., N., C., & Boutry, M. (2010). Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant Biotechnol. J.*, 8, 529-563
- Nagaya S, Kawamura K, Shinmyo A, Kato K. The HSP terminator of *Arabidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells. *Plant Cell Physiol* 2010;51:328–32
- 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
- Neale AD, Wahleithner JA, Lund M, Bonnett HT, Kelly A, Meeks-Wagner DR, Peacock WJ, Dennis ES (1990) *Plant Cell* 2, 673–684
- Negrout, V., Eisner, G., Lee, H.I., Han, K.P., Taylor, D. and Wong, H.C. (2005) Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce. *Plant Sci.*, 169, 433–438
- Nelson DE., Glaunsinger B., Bohnert HJ. (1997). Abundant accumulation of calcium-binding molecular chaperone calreticulin in specific floral tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114:29-37
- Neuhaus JM, Rogers JC (1998) Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol Biol* 38: 127–144

- Neuhaus J-marc & Martinoia E (2011). Plant Vacuoles. doi:10.1002/9780470015902.a0001675.pub2
- Neuhaus, J. M., L. Sticher, F. Meins, Jr. and T. Boller (1991b). "A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(22): 10362-6
- Niemes S, Labs M, Scheuring D, Krueger F, Langhans M, Jesenofsky B, Robinson DG, et al. (2010a). Sorting of plant vacuolar proteins is initiated in the ER, 601-614. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04171.x
- Niemes S, Langhans M, Viotti C, Scheuring D, San Wan Yan M, Jiang L, Hillmer S, Robinson DG, Pimpl P (2010b) Retromer recycles vacuolar sorting receptors from the trans-Golgi network. *Plant Journal* 61: 107-121
- 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
- Nuttall, J., Vine, N., Hadlington, J.L., Drake, P., Frigerio, L. and Ma, J.K.C. (2002) ER-resident chaperone interactions with recombinant antibodies in transgenic plants. *Eur. J. Biochem.*, 269, 6042–6051.
- Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, & Reddy SV (2011) *Advances in plant molecular farming. Biotechnology advances*, 29(2), 210-22. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.11.004
- Ocmant, A., & Mascart, F. (2007). Effective detection of celiac disease using salivary anti-transglutaminase. *American Journal of Medicine*, 120(10)
- Oliviusson, P., Heinzerling, O., Hillmer, S., Hinz, G., Tse, Y.C., Jiang, L., and Robinson, D.G. (2006). Plant retromer, localized to the prevacuolar compartment and microvesicles in Arabidopsis, may interact with vacuolar sorting receptors. *Plant Cell* 18, 1239–1252
- Orum H, Andersen PS, Oster A, Johansen LK, Rise E, Bjornvad M, Svendsen I, Engberg J (1993) Efficient method for constructing comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage. *Nucleic Acids Research* 21: 4491-4498
- Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W.H. and Granell, A. (2006) Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol.* 140, 3–11
- Otegui MS, Herder R, Schulze J, Jung R, Staehelin LA (2006) The proteolytic processing of seed storage proteins in Arabidopsis embryo cells starts in the multivesicular bodies. *Plant Cell* 18: 2567-2581
- Otegui MS, Noh YS, Martínez DE, Vila Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM, Guimmet JJ (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. *Plant Journal* 41: 831-844
- Oufattole M, Park, H, Poxleitner M, Jiang L & Rogers JC (2005) Selective Membrane Protein Internalization Accompanies Movement from the Endoplasmic Reticulum to the Protein Storage Vacuole Pathway in Arabidopsis. *Society*, 17(November), 3066-3080. doi:10.1105/tpc.105.035212.1
- Paccalet T, Bardor M, Rihouey C, Delmas F, Chevalier C, D'Aoust MA (2010). Engineering of a sialic acid synthesis pathway in transgenic plants by expression of bacterial Neu5Ac-synthesizing enzymes. *Plant Biotechnol J* 5:16–25
- Palacpac NQ, Yoshida S, Sakai H, Kimura Y, Fujiyama K, Yoshida T, Seki T. 1999. Stable expression of human  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase in plant cells modifies N-linked glycosylation patterns. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:4692–4697
- Paris N, Stanley CM, Jones RL, Rogers JC (1996) Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell.* 85: 563 – 572
- Park JH, Oufattole M, Rogers JC (2007) Golgi-mediated vacuolar sorting in plant cells: RMR proteins are sorting receptors for the protein aggregation/membrane internalization pathway. *Plant Sci* 172: 728–745
- Park M, Kim SJ, Vitale A, Hwang I (2004) Identification of the protein storage vacuole and protein targeting to the vacuole in leaf cells of three plant species. *Plant Physiol* 134: 625–639
- Park M, Lee D, Lee GJ, Hwang I (2005) AtRMR1 functions as a cargo receptor for protein trafficking to the protein storage vacuole. *J Cell Biol* 170: 757–767
- Pattison, R.J., and Amtmann, A. (2009). N-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants. *Trends Plant Sci.* 14, 92–99
- Paul M, & Ma JKC (2011) Plant-made pharmaceuticals: Leading products and production platforms. *Biotechnology and applied biochemistry*, 58(1), 58-67. doi:10.1002/bab.6

- 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: 1869-1042
- Petrucelli S, Molina MI, Lareu FJ, 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
- Petrucelli S, Otegui MS, Lareu F, Tran Dinh O, Fitchette AC, Circosta A, Rumbo M, Bardor M, Carcamo R, Gomord V, Beachy RN (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
- Phillipson BA, Pimpl P, daSilva LL, Crofts AJ, Taylor JP, Movafeghi A, Robinson DG and Denecke J (2001) Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COPII dependent. *Plant Cell* 13: 2005-2020
- Pogue, G.P., Vojdani, F., Palmer, K.E., Hiatt, E., Hume, S., Phelps, J., Long, L., Bohorova, N., Kim, D., Pauly, M., Velasco, J., Whaley, K., Zeitlin, L., Garger, S.J., White, E., Bai, Y., Haydon, H. and Bratcher, B. (2010) Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. *Plant Biotechnol.* 8, 638-654
- Pollack A (2006) Genentech Caps Cost of Cancer Drug for Some Patients. *New York Times* October 12
- Porter, R.R. (1973). Structural studies of immunoglobulins. *Science* 180, 713- 716
- Prince, H. E. (2006). Evaluation of the INOVA diagnostics enzyme-linked immunosorbent assay kits for measuring serum immunoglobulin G (IgG) and IgA to deamidated gliadin peptides. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(1), 150-151
- Rademacher, T., Sack, M., Arcalis, E., Stadlmann, J., Balzer, S., Altmann, F., Quendler, H., Stiegler, G., Kunert, R., Fischer, R. and Stoger, E. (2008) Recombinant antibody 2G12 produced in maize endosperm efficiently neutralizes HIV-1 and contains predominantly single-GlcNAc N-glycans. *Plant Biotechnol. J.*, 6, 189-201
- Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJS (2000) Species-specific variation in glycosylation of Igc: Evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 10: 477-486
- Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJS (2000) Species-specific variation in glycosylation of Igc: Evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 10: 477-486
- Ramessar, K., Rademacher, T., Sack, M., Stadlmann, J., Platis, D., Stiegler, G., Labrou, N., Altmann, F., Ma, J., Stoger, E., Capell, T. and Christou, P. (2008) Cost-effective production of a vaginal protein microbicide to prevent HIV transmission. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 105, 3727-3732
- Ramirez, N., Rodriguez, M., Ayala, M., Cremata, J., Perez, M., Martinez, A., Linares, M., Hevia, Y., Paez, R., Valdes, R., Gavilondo, J.V. and Selman-Housein, G. (2003) Expression and characterization of an anti-(hepatitis B surface antigen) glycosylated mouse antibody in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants and its use in the immunopurification of its target antigen. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 38, 223-230
- Rathlisberger D, Honegger A, Pluckthun, A. (2005) Domain interactions in the Fab fragment: A comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *Journal of Molecular Biology* 347: 773-789
- Reggi, S., Marchetti, S., Patti, T., Amicis, F.D., Cariati, R., Bembi, B. and Fogher, C. (2005) Recombinant human acid b- glucosidase stored in tobacco seed is stable, active and taken up by human fibroblasts. *Plant Mol. Biol.*, 57, 101-113
- Reichert JM (2007) Trends in the development and approval of monoclonal antibodies for viral infections. *BioDrugs* 21: 1-7
- Reyes FC, Buono R, Otegui MS (2011) Plant endosomal trafficking pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 666-673
- Rivera J, Nakouzi A, Abboud N, Revskaya E, Goldman D, Collier RJ, Dadachova E, Casadevall A (2006) A monoclonal antibody to *Bacillus anthracis* protective antigen defines a neutralizing epitope in domain 1. *Infect Immun* 74: 4149-4156
- Robinson DG, Oliviussou P, Hinz G (2005) Protein sorting to the storage vacuoles of plants: a critical appraisal. *Traffic* 6: 615-625

- Rodrigues ME, Costa AR, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R (2010) Technological progresses in monoclonal antibody production systems. *Biotechnology Progress* 26: 332-351
- Rodríguez M, Ramírez NI, Ayala M, Freyre F, Pérez L, Selman-Housein G, Gavilondo JV, Pujol M, Triguero A, Mateo C (2005) Transient expression in tobacco leaves of an aglycosylated recombinant antibody against the epidermal growth factor receptor. *Biotechnology and Bioengineering* 89: 188-194
- Rohatgi S, Dutta D, Tahir S, Sehgal D (2009) Molecular dissection of antibody responses against pneumococcal surface protein A: Evidence for diverse DH-less heavy chain gene usage and avidity maturation. *Journal of Immunology* 182: 5570-5585
- Rohatgi S, Ganju P, Sehgal D (2008) Systematic design and testing of nested (RT-)PCR primers for specific amplification of mouse rearranged/expressed immunoglobulin variable region genes from small number of B cells. *Journal of Immunological Methods* 339: 205-219
- Rojo E, Denecke J (2008) What Is Moving in the Secretory Pathway of Plants? *In*, Vol 147, pp 1493-1503
- Rosado A, Raikhel NV (2010) Understanding plant vacuolar trafficking from a systems biology perspective. *Plant Physiology* 154: 545-550
- Rouwental DEA, Florack T, Hesselink JH, Cordewener J, Bosch D (2009) Synthesis of Lewis X epitopes on plant N-glycans. *Carbohydrate Research*, 344 (12) 1487-1493
- Rouwental, G. J. A., Wuhrer, M., Deelder, M., Bakker, H., Stoop, G. M., Hokke, H., & Bosch, D. (2007). Efficient introduction of a bisecting GlcNAc residue in tobacco N-glycans by expression of the gene encoding human N-acetylglucosaminyltransferase III. *Access*, 17(3), 334-344. doi:10.1093/glycob/cwl078
- Rumbo M, Chirido FG, Fossati CA, Añón MC (2000) Analysis of anti-prolamin monoclonal antibody reactivity using prolamin fractions purified by preparative electrophoresis. *Food and Agricultural Immunology* 12: 41-52
- 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
- Saalbach, G., M. Rosso and U. Schumann (1996). "The vacuolar targeting signal of the 2S albumin from Brazil nut resides at the C terminus and involves the C-terminal propeptide as an essential element." *Plant Physiol.* 112(3): 975-985
- Sabrina Y, Ali M, Nakano H (2010) In vitro generation of anti-hepatitis B monoclonal antibodies from a single plasma cell using single-cell RT-PCR and cell-free protein synthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109: 75-82
- Sack, M., Paetz, A., Kunert, R., Bomble, M., Hesse, F., Stiegler, G., Fischer, R., Katinger, H., Stoeger, E. and Rademacher, T. (2007) Functional analysis of the broadly neutralizing human anti-HIV-1 antibody 2F5 produced in transgenic BY-2 suspension cultures. *FASEB J.*, 21, 1655–1664
- Sainsbury F, Lavoie PO, D'Aoust MA, VÃ©zina LP, Lomonosoff GP (2008) Expression of multiple proteins using full-length and deleted versions of cowpea mosaic virus RNA-2. *Plant Biotechnology Journal* 6: 82-92
- Sainsbury, F. and Lomonosoff, G.P. (2008) Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiol.*, 148, 1212–1218
- Saint-Jean B, Seveno-Carpentier E, Alcon C, Neuhaus JM, Paris N (2010) The cytosolic tail dipeptide Ile-Met of the pea receptor BP80 is required for recycling from the prevacuole and for endocytosis. *Plant Cell* 22(8):2825–2837
- Saleem M, Kamal M (2008) Monoclonal antibodies in clinical diagnosis: A brief review application. *African Journal of Biotechnology* 7: 923-925
- Sanderfoot AA, Ahmed SU, Marty-Mazars D, Rapoport I, Kirchhausen T, Marty F, RaikhelNV (1998) A putative vacuolar cargo receptor partially colocalizes with AtPEP12p on a prevacuolar compartment in Arabidopsis roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9920–9925
- Sardana, Ravinder. 2007. Biologically Active Human GM-CSF Produced in the Seeds of Transgenic Rice Plants. *Transgenic Research*. 16: 713-721
- Satoh M, Iida S, Shitara K (2006) Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. *Expert Opinion on Biological Therapy* 6: 1161-1173
- Schahs M, Strasser R, Stadlmann J, Kunert R, Rademacher T, Steinkellner H. (2007) Production of a monoclonal antibody in plants with a humanized N-glycosylation pattern. *Plant Biotech J* 5:657–63
- Schaller, A. (2004). A eut above the rest: The regulatory function of plant proteases. *Planta* 220, 183-197

- Schillberg S, Zimmermann S, Voss A, Fischer R (1999) Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic Res* 8:255–263. doi:10.1023/A:1008937011213
- Schoberer J, & Strasser R (2011) Sub-Compartmental Organization of Golgi-Resident N-Glycan Processing Enzymes in Plants. *Plant Cell*, 4(2). doi:10.1093/mp/ssp082
- Schünmann PHD, Coia G, Waterhouse PM (2002) Biopharming the SimpliRED™ HIV diagnostic reagent in barley, potato and tobacco. *Molecular Breeding* 9: 113-121
- Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, Baum G, Brill-Almon E, Galili G (2007) Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J* 5: 579–90
- Shaaltiel Y, Hashmueli S, Bartfeld D, Baum G, Ratz T, Mizrahi E, Forester Y (2006) SYSTEM AND METHOD FOR PRODUCTION OF ANTIBODIES IN PLANT CELL CULTURE. In EUROPEAN PATENT.
- Shami EY (1995) Engineering resistance to trypsin inactivation into L-asparaginase through the production of a chimeric protein between the enzyme and a protective single-chain antibody. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 757-764
- Sharma MK, Singh NK, Jani D, Sisodia R, Thungapathra M, Gautam JK et al. 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*) (2008) *Plant Cell Rep* 27:307–18
- Sharma, A.K. and Sharma, M.K. (2009) Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities. *Adv. Biotech.* 27, 811–832
- Sharp, J.M. and Doran, P.M. (2001) Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnol. Prog.*, 17, 979–992
- Sharp, J.M. and Doran, P.M. (2001a) Characterization of monoclonal antibody fragments produced by plant cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 73, 338–346.
- Shen Y, Wang J, Ding Y, Lo SW, Gouzerh G, Neuhaus J-M, Jiang L (2011) The Rice RMR1 Associates with a Distinct Prevacuolar Compartment for the Protein Storage Vacuole Pathway. *Molecular Plant*
- Shimada T, Fuji K, Tamura K, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2003) Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 100: 16095-16100
- Shimada T, Fuji K, Tamura K, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2003) Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 100: 16095-16100
- Shimada T, Watanabe E, Tamura K, Hayashi Y, Nishimura M, Hara-Nishimura I (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
- Shinshi y col, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EEUU 85: 5541 - 5545 (1988)
- Snapp EL, Sharma A, Lippincott-schwartz J, & Hegde RS (2006) Monitoring chaperone engagement of substrates in the endoplasmic reticulum of live cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(17): 6536-6541
- Song MK, Oh MS, Lee JH, Lee JN, Chung JH, Park SG, Choi IH (2000) Light chain of natural antibody plays a dominant role in protein antigen binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268: 390-394
- Sorell, L., López, J. A., Valdés, I., Alfonso, P., Camafeita, E., Acevedo, B., Chirido, F., Gavilondo, J., Méndez, E. (1998). An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis. *FEBS Letters*, 439(1-2), 46-50
- Sorrentino A, Schillberg S, Fischer R, Rao R, Porta R and Mariniello L. Recombinant human tissue transglutaminase produced into tobacco suspension cell cultures is active and recognizes autoantibodies in the serum of coeliac patients. *Int J Biochem Cell Biol* (2005)37:842–851
- Sorrentino, A., Schillberg, S., Fischer, R., Porta, R., & Mariniello, L. (2009) Molecular farming of human tissue transglutaminase in tobacco plants. *Amino Acids*, 36(4), 765-772
- Sriraman R, Bardor M, Sack M, Vaquero C, Faye L, Fischer R, Finnern R, Lerouge P (2004) Recombinant anti-hCG antibodies retained in the endoplasmic reticulum of transformed plants lack core-xylose and core-(1,3)-fucose residues. *Plant Biotechnology Journal* 2: 279-287
- Stacy KM (2005) Therapeutic MAbs: Saving Lives and Making Billions *The Scientist* 19: 17

- Steinkellner H, Loos, A., Van Droogenbroeck, B., Hillmer, S., Grass, J., Kunert, R., Cao, J., Robinson, D. G., (2010). Production of monoclonal antibodies with a controlled N-glycosylation pattern in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant biotechnology journal*, 1-14. doi:10.1111/j.1467-7652.2010.00540.x
- 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 Physiol.*, 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
- Strasser R, Castilho A, Stadlmann J, Kunert R, Quendler H, Gatteringer P, Jez J, Rademacher T, Altmann F, Mach L, et al. (2009) Improved virus neutralization by plant-produced anti-HIV antibodies with a homo- geneous  $\beta$ 1,4-galactosylated N-glycan profile. 284:20479–20485
- Strasser R, Mucha J, Schwihla H, Altmann F, Glossl J and Steinkellner H (1999) Molecular cloning and characterization of cDNA coding for beta1,2N-acetylglucosaminyltransfer-ase I (GlcNAc-TI) from *Nicotiana tabacum*. *Glycobiology*. 9, 779–785.
- Strasser, R., et al. (2007). A unique beta1,3-galactosyltransferase is indispensable for the biosynthesis of N-glycans containing Lewis a structures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 19, 2278–2292.
- Strasser, R., Schoberer, J., Jin, C., Gloessl, J., Mach, L., and Steinkellner, H. (2006). Molecular cloning and characterization of *Arabidopsis thaliana* Golgi alpha-mannosidase II, a key enzyme in the formation of complex N-glycans in plants. *Plant J*. 45, 789–803.
- Streatfield SJ. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants (2007) *Plant Biotechnol J* 5:2-15
- Streatfield, S. J., et al. (2003). "Corn as a production system for human and animal vaccines." *Vaccine* 21(7-8): 812-5
- Suen PK, Shen J, Sun, S.S., and Jiang, L (2010) Expression and characterization of two functional vacuolar sorting receptor (VSR) proteins, BP-80 and AtVSR4 from culture media of trans- genic tobacco BY-2 cells. *Plant Sci*. 179, 68–76
- 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
- Thies, M.J.W., Mayer, J., Augustine, J.G., Frederick, C.A., Lilie, H., and Buchner, J. (1999). Folding and association of the antibody domain C(H)3: prolyl isomerization precedes dimerization. *J. Mol. Biol*. 293, 67–79
- Tormakangas K, Hadlington JL, Pimpl P, Hillmer S, Brandizzi F, Teeri TH, Denecke J (2001) A Vacuolar Sorting Domain May Also Influence the Way in Which Proteins Leave the Endoplasmic Reticulum. *PLANT CELL* 13: 2021-2032
- Tramontano A, Chothia C, Lesk AM (1990) Framework residue 71 is a major determinant of the position and conformation of the second hypervariable region in the V(H) domains of immunoglobulins. *Journal of Molecular Biology* 215: 175-182
- Tran, M., Zhou, B., Pettersson, P. L., Gonzalez, M. J., & Mayfield, S. P. (2009). Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(4), 663-673
- Twyman, R. M., Schillberg, S., & Fischer, R. (n.d.). The Production of Vaccines and Therapeutic Antibodies in Plants. *Media*, 145-159. doi:10.1007/978-94-007-2217-0
- Valdes, R., Gomez, L., Padilla, S., Brito, J., Reyes, B., Alvarez, T., Mendoza, O., Herrera, O., Ferro, W., Pujol, M., Leal, V., Linares, M., Hevia, Y., Garcia, C., Mila, L., Garcia, O., Sanchez, R., Acosta, A., Geada, D., Paez, R., Vega, J.L. and Borroto, C. (2003) Large-scale purification of an antibody directed against hepatitis B surface antigen from transgenic tobacco plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308, 94–100
- Valls LA, Winther JR, Stevens TH (1990) Yeast carboxypeptidase Y vacuolar targeting signal is defined by four propeptide amino acids. *J Cell Biol* 111: 361-368
- Van Droogenbroeck B, Cao J, Stadlmann J, Altmann F, Colanesi S, Hillmer S, Robinson DG, Van Lerberge E, Terry N, Van Montagu M, Liang M, Depicker A, De Jaeger G (2007) Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic *Arabidopsis* seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 1430-1435

- van Engelen, F.A., Schouten, A., Molthoff, J.W., Roosien, J., Salinas, J., Dirkse, W.G., Schots, A., Bakker, J., Gommers, F.J., Jongsma, M.A., Bosch, D. and Stiekema, W.J. (1994) Coordinate expression of antibody subunit genes yields high- levels of functional antibodies in roots of transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 26, 1701–1710
- Vaquero C, Sack M, Chandler J, Drossard J, Schuster F, Monecke M, Schillberg S, Fischer R (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *PNAS* 96: 11128-11133
- Verch T, Yusibov V, Koprowski H (1998) Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *Journal of Immunological Methods* 220: 69-75
- Vezina LP, Faye L, Lerouge P, D'Aoust MA, Marquet-Blouin E, Burel C, Lavoie PO, Bardor M, Gomord V (2009) Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnology Journal* 7: 442-455
- Villani, M.E., Morgun, B., Brunetti, P., Marusic, C., Lombardi, R., Pisoni, I., Bacci, C., Desiderio, A., Benvenuto, E. and Donini, M. (2009) Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. *Plant Biotechnol. J.*, 7, 59–72
- Vitale A and Chrispeel MJ. (1984). Transient N-acetylglycosamine in the biosynthesis of phytohemagglutinin: attachment in the Golgi apparatus and removal in the protein bodies. *J Cell Biol* 99:133-140.
- Vitale A, Boston RS (2008) Endoplasmic reticulum quality control and the unfolded protein response: Insights from plants. *Traffic* 9: 1581-1588
- Vitale A, Ceriotti A (2004) Protein Quality Control Mechanisms and Protein Storage in the Endoplasmic Reticulum. A Conflict of Interests? *Plant Physiology* 136: 3420-3426
- Vitale A, Hinz G (2005) Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *Trends in Plant Science* 10: 316-323
- Vitale A, Raikhel NV (1999) What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends Plant Sci* 4: 149–155
- Vitale A., Bielli A., Ceriotti A. (1995). The binding protein associates with monomeric phaseolin. *Plant Physiol* 107:1411-1418
- Vitale, A. and Pedrazzini, E. (2005) Recombinant pharmaceuticals from plants: the plant endomembrane system as bioreactor. *Mol. Interv.* 5, 216–225
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal* 33: 949-956
- von Schaeuwen A, Chrispeels MJ (1993) Identification of vacuolar sorting information in phytohemagglutinin, an unprocessed vacuolar protein. *J Exp Bot* 44: 339–342
- Voss, A., Niersbach, M., Hain, R., Hirsch, H.J., Liao, Y.C., Kreuzaler, F. and Fischer, R. (1995) Reduced virus infectivity in *nicotiana-tabacum* secreting a tmv-specific full-size antibody. *Mol. Breed*, 1, 39–50
- Wang A and Ma S (2012) Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects, DOI 10.1007/978-94-007-2217-0\_7
- Wang H, Rogers JC, Jiang L (2011) Plant RMR proteins: Unique vacuolar sorting receptors that couple ligand sorting with membrane internalization. *FEBS Journal* 278: 59-68
- Wang H, Wang JQ, Ding Y, Hillmer S, Robinson D and Jiang L (2011) Vacuolar sorting receptor proteins reach plasma membrane in pollen tubes. *Mol. Plant.* doi:10.1093/mp/ssr011
- Wang J, Li Y, Sze WL, Hillmer S, Sun SSM, Robinson DG, Jiang L (2007) Protein mobilization in germinating mung bean seeds involves vacuolar sorting receptors and multivesicular bodies. *Plant Physiology* 143: 1628-1639
- Wang Y, Chen W, Li X, Cheng B (2006) Degenerated primer design to amplify the heavy chain variable region from immunoglobulin cDNA. *BMC Bioinformatics* 7
- Wang Z, Raifu M, Howard M, Smith L, Hansen D, Goldsby R & Ratner D (2000) Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions : the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3 X to 5 X exonuclease activity, 167-177
- Wang Z, Raifu M, Howard M, Smith L, Hansen D, Goldsby R, Ratner D (2000) Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J Immunol Methods* 233: 167-177

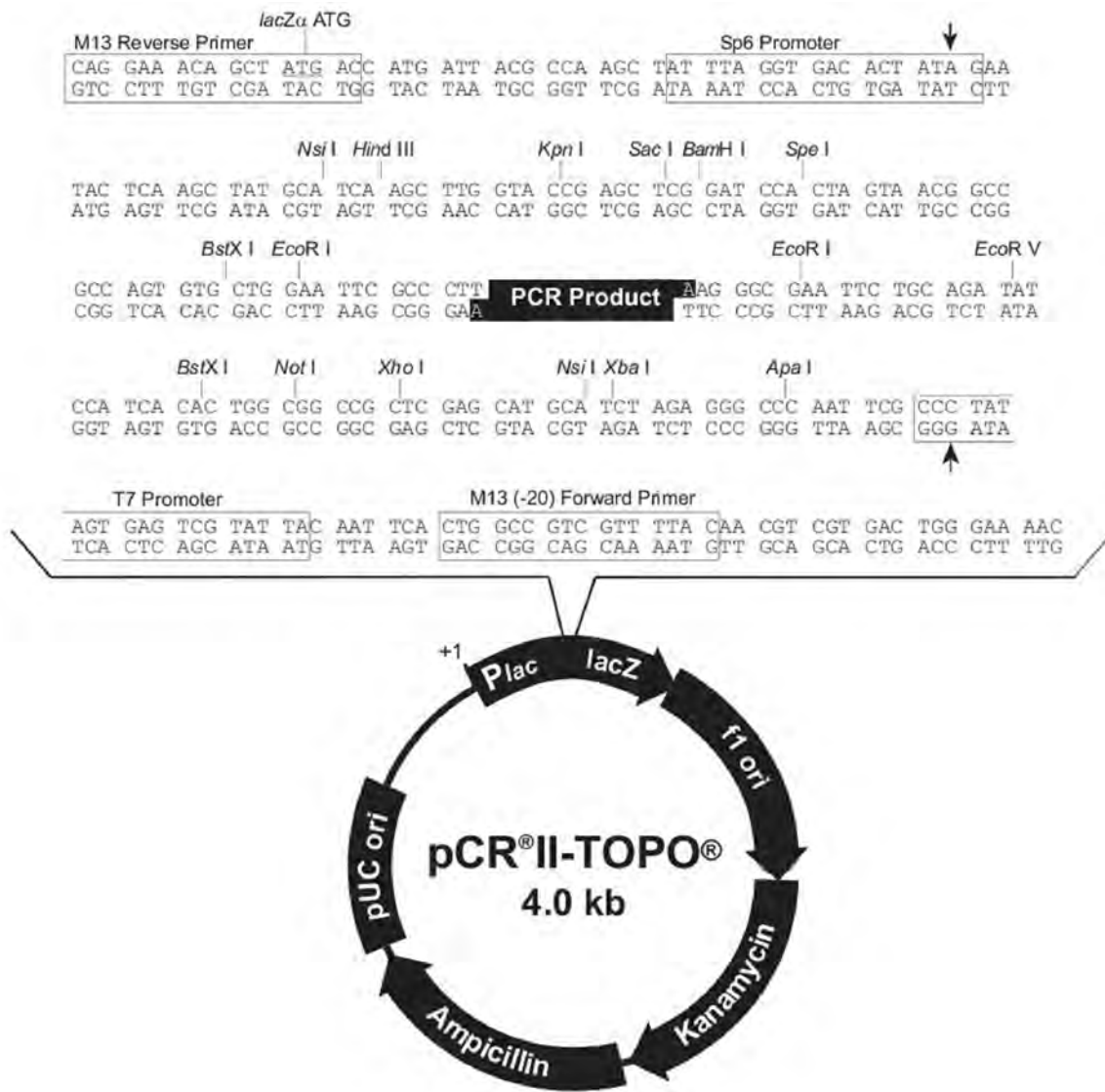


- Watanabe E, Shimada T, Kuroyanagi M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2002) Calcium-mediated Association of a Putative Vacuolar Sorting Receptor PV72 with a Propeptide of 2S Albumin. *J. Biol. Chem.* 277: 8708-8701
- Whaley KJ, Hiatt A, Zeitlin L (2011) Emerging antibody products and Nicotiana manufacturing. *Human Vaccines* 7: 349-356
- White DA, Barlow AK, Clarke IN, Heckels JE (1990) Stable expression of meningococcal class 1 protein in an antigenically reactive form in outer membranes of Escherichia coli. *Molecular Microbiology* 4: 769-776
- Wieland WH, Orzáez D, Lammers A, Parmentier HK, Versteegen MWA, Schots A (2004) A functional polymeric immunoglobulin receptor in chicken (*Gallus gallus*) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity. *Biochemical Journal* 380: 669-676
- Winterroth L, Rivera J, Nakouzi AS, Dadachova E, Casadevall A (2010) Neutralizing monoclonal antibody to edema toxin and its effect on murine anthrax. *Infection and Immunity* 78: 2890-2898
- Wycoff KL (2005) Secretory IgA antibodies from plants. *Current Pharmaceutical Design* 11: 2429-2437
- Yang JJ, Barr LA, Fahnestock SR, Liu ZB (2005) High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting. *Transgenic Res* 14: 313-24
- Yano, A., Maeda, F. and Takekoshi, M. (2004) Transgenic tobacco cells producing the human monoclonal antibody to hepatitis B virus surface antigen. *J. Med. Virol.*, 73, 208-215
- Zeitlin L, Cone RA, Whaley JK (1999) Using Monoclonal Antibodies to Prevent Mucosal Transmission of Epidemic Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases* 5: 54-64
- Zeitlin L, Palmer C, Whaley K (2002) Preventing sexual transmission of HSV and HIV: the challenge for active and passive immunization of mucosal surfaces. *Biotechnol Genet Eng Rev* 19: 121-138
- Zeitlin, L., Olmsted, S.S., Moench, T.R., Co, M.S., Martinell, B.J., Paradkar, V.M., Russell, D.R., Queen, C., Cone, R.A. and Whaley, K.J. (1998) A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat. Biotechnol.*, 16, 1361-1364
- Zhao, R.M., Moriau, L. and Boutry, M. (1999) Expression analysis of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase pma4 transcription promoter from *Nicotiana plumbaginifolia* activated by the CaMV 35S promoter enhancer. *Plant Sci.*, 149, 157-165
- Zouhar J, Munoz A and Rojo E (2010) Functional specialization within the Vacuolar Sorting Receptor family: VSR1, VSR3 and VSR4 sort vacuolar storage cargo in seeds and vegetative tissues. *Plant J.* 64, 577-588

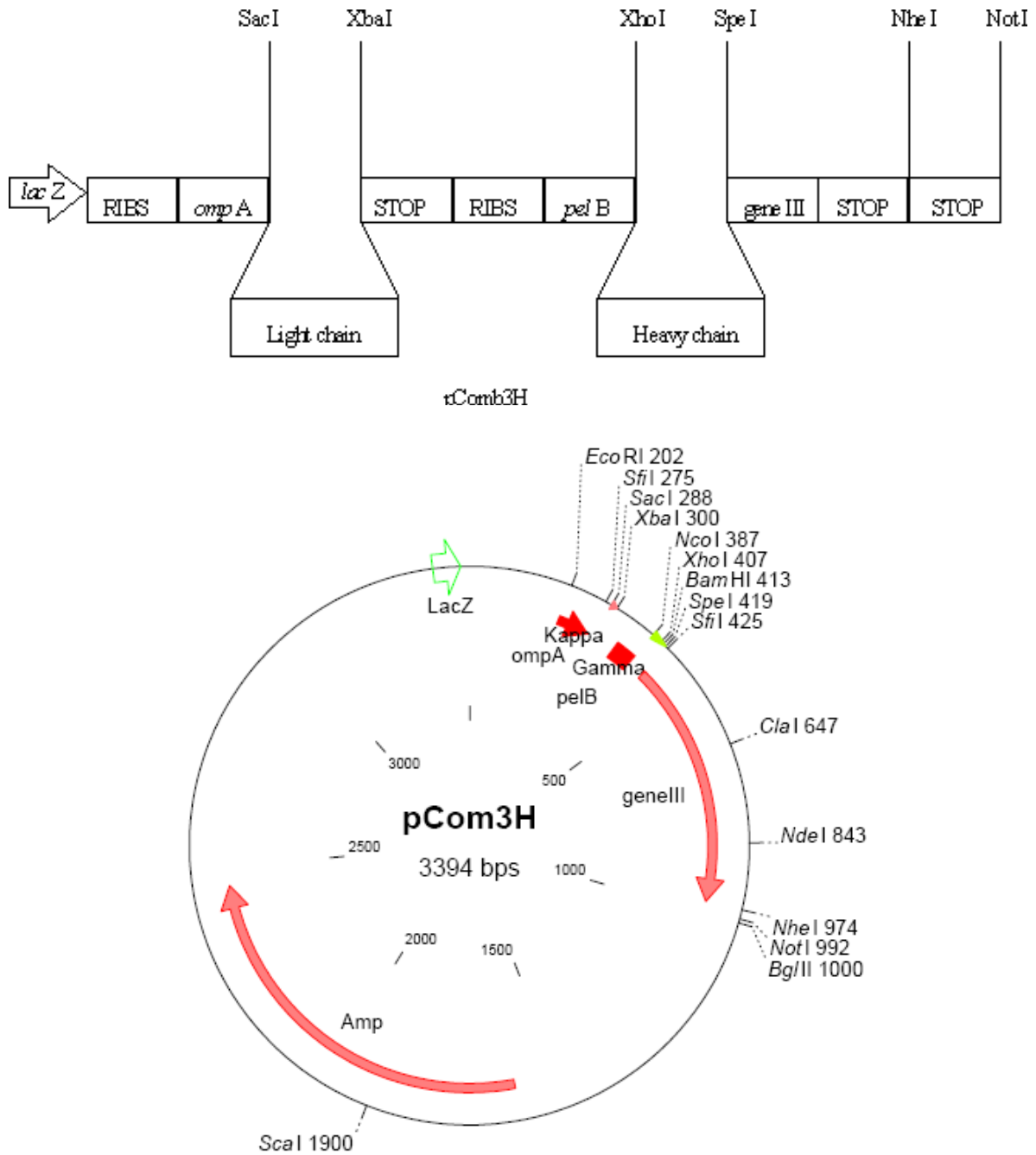


# Anexo

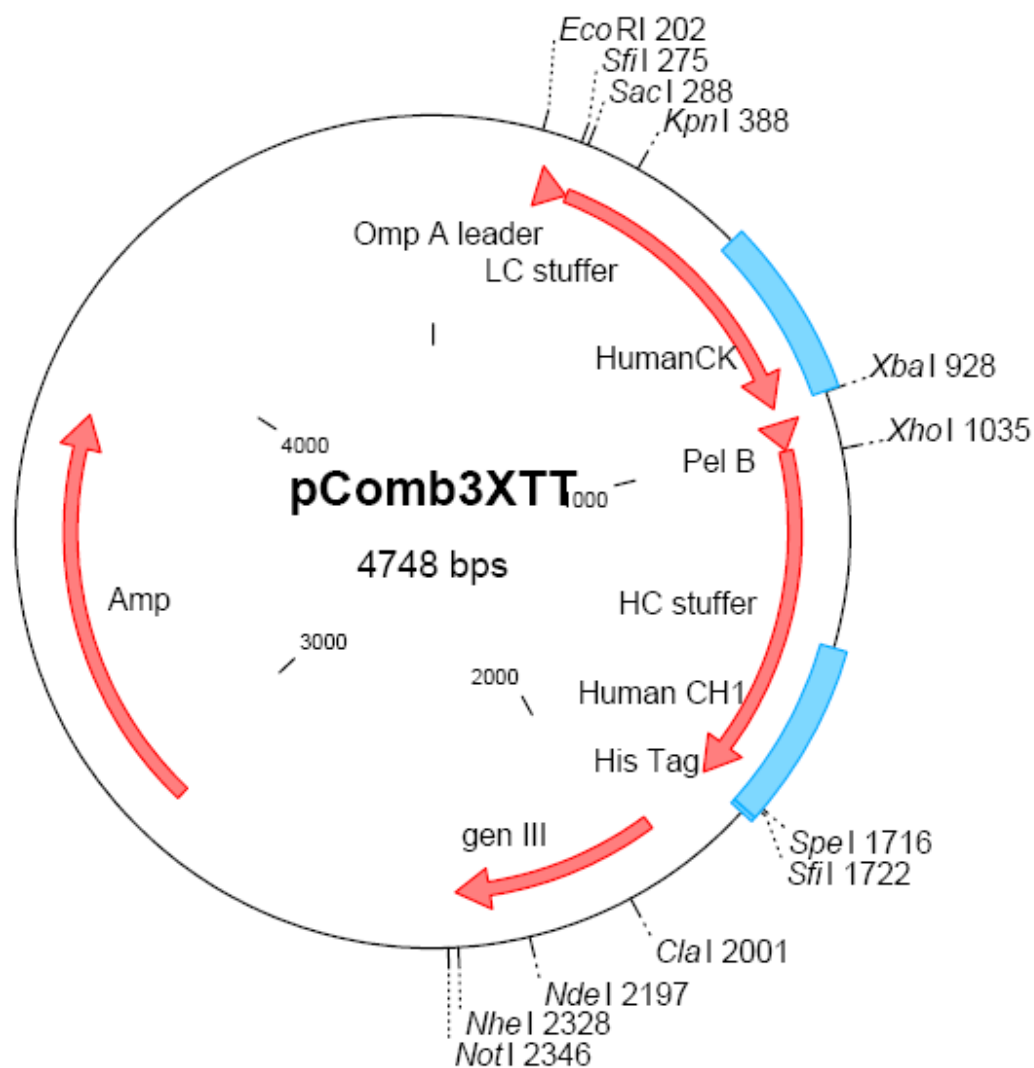




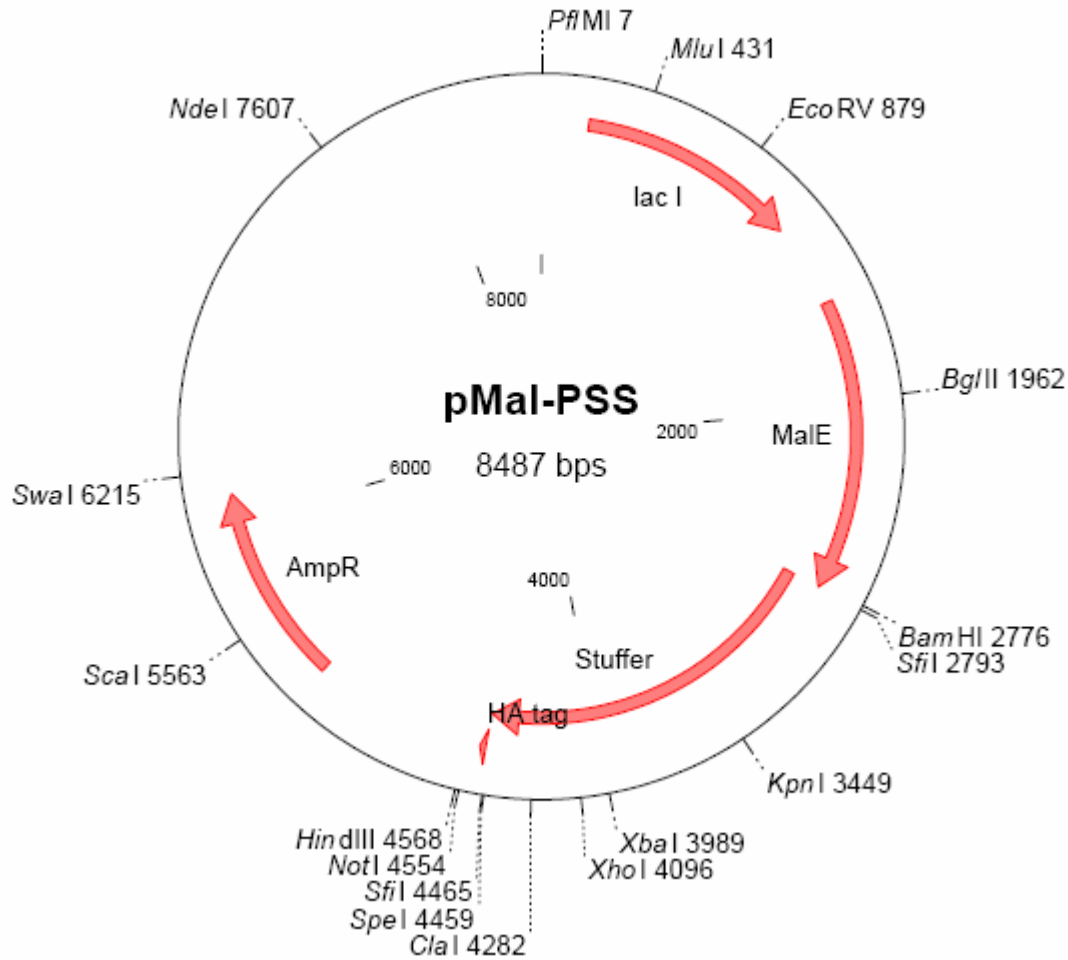
**Figura A.1:** pCRII-TOPO usado en el clonado del producto de amplificación de las cadenas de los anticuerpos obtenidas en la estrategia general de clonado.



**Figura A.2:** pCom3H usado en el clonado del producto de amplificación Fab no quimérico.



**Figura A.3:** pComb3XTT: usado en el clonado del producto de amplificación Fab o scFv. Además contiene los dominios constantes CK y CH1 humanos utilizados en la quimerización y un Tag de histidinas.



**Figura A.4:** pMal-PSS: usado en el clonado del producto de amplificación Fab o scFv. El vector posee la proteína de unión a maltosa MBP (Maltosa binding protein) y una señal de direccionamiento al periplasma y un HA Tag.

# A fluorescent reporter protein containing AtRMR1 domains is targeted to the storage and central vacuoles in *Arabidopsis thaliana* and tobacco leaf cells

Camila María Scabone · Lorenzo Frigerio ·  
Silvana Petruccelli

Received: 3 May 2011 / Accepted: 9 May 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** To develop a new strategy to target recombinant proteins to the vacuolar storage system in transgenic plants, the ability of the transmembrane and cytosolic domains of Arabidopsis receptor homology-transmembrane-RING H2-1 (AtRMR1) was evaluated. A secreted version of RFP (secRFP) and a fusion of it to the transmembrane and cytosolic domains of AtRMR1 (RFP-TMCT) were produced and studied both in transient and stable expression assays. Transient expression in leaves of *Nicotiana tabacum* showed that secRFP is secreted to the apoplast while its fusion to TMCT of AtRMR1 is sufficient to prevent secretion of the reporter. In tobacco leaves, RFP-TMCT reporter showed an endoplasmic reticulum pattern in early expression stages while in late expression stages, it was found in the vacuolar lumen. For the first time, the role of TM and CT domains of AtRMR1 in stable expression in *Arabidopsis thaliana* is presented; the fusion of TMCT to secRFP is sufficient to sort RFP to the lumen of the central vacuoles in leaves and roots and to the lumen of PSV in cotyledons of mature embryos. In addition, biochemical

studies performed in extract from transgenic plants showed that RFP-TMCT is an integral membrane protein. Full-length RFP-TMCT was also found in the vacuolar lumen, suggesting internalization into destination vacuole. Not colocalization of RFP-TMCT with tonoplast and plasma membrane markers were observed. This membrane vacuolar determinant sorting signal could be used for future application in molecular pharming as an alternative means to sort proteins of interest to vacuoles.

**Keywords** Membrane proteins · RMR · Vacuolar sorting signal · PSV · Plant expression · Seed expression

## Abbreviations

VSS	Vacuolar sorting signals
ctVSS	C-terminal VSS
VSR	Vacuolar sorting receptor
RFP	Monomeric red fluorescent protein
PSV	Protein storage vacuole
RMR	Receptor homology-transmembrane-RING H2
TM	Transmembrane
CT	Cytosolic tail
TIP	Tonoplast intrinsic protein
CLSM	Confocal laser scanning microscopy

Communicated by F. Brandizzi.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00299-011-1089-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. M. Scabone · S. Petruccelli (✉)  
Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología  
de Alimentos (CIDCA), CCT-La Plata CONICET,  
Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias  
Exactas, Universidad Nacional de la Plata, CC553,  
1900 La Plata, Argentina  
e-mail: silvana@biol.unlp.edu.ar

L. Frigerio  
School of Life Sciences, University of Warwick,  
Coventry CV4 7AL, UK

## Introduction

Numerous efforts have been made over the last decades to develop and optimize plant expression platforms for the large-scale production of both industrial and clinically useful proteins (Fischer et al. 2004; Ma et al. 2005; Stoger et al. 2005), with a few successful examples (Faye and

Gomord 2010). Recombinant protein degradation in plant expression systems is one of the main factors that causes low final yield and heterogeneity of the resulting protein product, therefore limiting efficacy of plant platforms. Several strategies have been proposed to avoid proteolytic processing, and a promising option is the accumulation of the recombinant proteins in storage vacuoles, which constitute a naturally safe environment (Benchabane et al. 2008; Petruccioli et al. 2006). Vacuolar sorting is, however, a very complex process since different types of vacuolar sorting pathways have been reported in diverse plant species and tissues (Herman and Larkins 1999; Vitale and Hinz 2005; Zouhar and Rojo 2009). In addition, the molecular mechanisms involved in protein recognition and sorting are not fully understood (Hinz et al. 2007; Jolliffe et al. 2005).

Transport of soluble proteins to vacuoles is a saturable process (Frigerio et al. 1998) that depends on the presence of vacuolar sorting signals (VSS) in their structure (Denecke et al. 1990; Vitale and Raikhel 1999). Three different types of VSS have been described: located at the N- or C-terminus, or within internal sequences of the vacuolar proteins. The sequence-specific VSS (ssVSS) NPIXL/NPIR motifs usually reside within propeptides located at N-terminus (but also can work if present in internal or C-terminus positions) and an aliphatic Ile or Leu residue is crucial for sorting (Matsuoka and Nakamura 1999). In contrast, C-terminal VSS (ctVSS) do not have similarity in amino acid composition and length, but are generally rich in hydrophobic residues and must be accessible at the C-terminus (Matsuoka and Neuhaus 1999; Vitale and Hinz 2005). Internal sorting signals are less well defined and it has been suggested that they could act as physical determinants triggering aggregation, which would then result in sorting (Holkeri and Vitale 2001; Maruyama et al. 2006; Neuhaus and Rogers 1998; Petruccioli et al. 2007).

Two families of vacuolar sorting receptors have been shown to interact with VSS: VSR/BP-80/AtELP (80 kDa membrane protein first found in clathrin-coated vesicles of developing pea seeds and then cloned in *Arabidopsis* and named AtELP for *Arabidopsis thaliana* epidermal growth factor-like protein) (Ahmed et al. 1997; Kirsch et al. 1994; Paris et al. 1997, 2002) and RMR (receptor-transmembrane sequence-RING-H2) (Jiang et al. 2000). The role of these putative receptors in sorting cargo proteins to vacuoles is still the subject of current research (Hinz et al. 2007; Craddock et al. 2008; Zouhar et al. 2010; Wang et al. 2011). VSR are characterized for having a signal peptide, a luminal domain (LU) that recognizes the VSS, a transmembrane domain (TM) and a cytosolic tail (CT) which is involved in the regulation of receptor trafficking (DaSilva et al. 2006; Saint-Jean et al. 2010). AtRMRs are composed

of an N-terminal LU region consisting of a single protease associated (PA) domain (but lacking EGF-repeats present in VSRs), a TM domain predicted to be a type I integral membrane protein, and a C-terminal CT region that has a RING-H2 domain and a serine-rich region (Jiang et al. 2000). Seven AtVSRs and six AtRMRs protein genes have been described in *Arabidopsis thaliana* (Shimada et al. 2003; Park et al. 2005). VSR and RMR proteins recognized different targets, e.g. aleurain is recognized by AtVSR, but not by AtRMR, and ctVSS of barley lectin, bean phaseolin and tobacco chitinase are recognized by AtRMR but not by AtVSR (Park et al. 2005, 2007). The lack of a conserved sequence in ctVSS of different vacuolar proteins suggests that the interaction between the VSS and the LU domain of RMR could be a low-affinity one. In this work, we studied a direct fusion of the cargo protein to non-luminal domains of AtRMR.

In relationship with the sorting information of AtRMR, Park et al. (2005) demonstrated that full-length AtRMR1 protein mainly localized in DIP (dark induced tonoplasmic intrinsic protein) organelle, but a minor portion also localized to the Golgi complex in transient expression *A. thaliana* leaf protoplasts. The DIP-positive organelle, according to Jiang et al. (2000) is the pre-vacuolar compartment (PVC) for the protein storage vacuole (PSV); and described AtRMR1 as a cargo receptor for protein trafficking to the protein storage vacuole. In addition, AtRMRs proteins were localized as components of the membrane-containing crystalloid in tobacco and tomato seed PSV (Jiang et al. 2000) and seed PSV of *A. thaliana* (Hinz et al. 2007). The AtRMR1 gene is expressed in most *A. thaliana* tissues regardless of the developing stage of the plant (Park et al. 2005).

In transient expression experiments performed in *A. thaliana* leaf protoplasts, to dissect functionally of the different domains of AtRMRs, it was shown that the TM and CT expressed without its LU domain, gave a punctate staining pattern that overlapped with Golgi marker ST-GFP suggesting that AtRMR1 without LU domain mainly localized at the Golgi complex (Park et al. 2005). In contrast, a reporter protein that contains proaleurain fused to the TM and CT from AtRMR2 traffic via Golgi apparatus to PSV-like compartment in transient expression of tobacco suspensions culture cells (Jiang et al. 2000). Unlike VSRs, the cytosolic tail of RMR protein is internalized into central vacuoles of tobacco suspension culture protoplast as part of the sorting process (Park et al. 2007; Wang et al. 2011).

In this study, we localized a fluorescent reporter fused to TM and CT from AtRMR1 protein using transgenic *A. thaliana* plants. A complete localization pattern in leaves, roots and seeds of transgenic *Arabidopsis* is presented. The development of a fluorescent reporter consisting of the



monomeric red fluorescent protein, with ability to fluoresce at the low pH of vacuoles facilitates live cell imaging studies. With this reporter, the sorting process of this membrane bound fluorescent protein was studied by colocalization studies with markers of the secretory pathway and also by biochemical assays. Finally, we investigated the hypothesis that TM and CT domains are a sufficient signal to deliver proteins to storage vacuoles in transgenic tissues for future application in molecular pharming.

## Materials and methods

### Recombinant DNA and generation of transgenic plants

A schematic representation of the constructs used in this study is shown in Fig. 1. All primer sequences are shown in Supplementary Table S1. To generate secRFP and RFP-TMCT, the monomeric RFP coding region was amplified by PCR with DNA polymerase (Invitrogen Argentina, SA, Buenos Aires, Argentina) from pcDNA3.1-mRFP (Snapp et al. 2006), using primers 1 and 2, that were designed to fuse RFP in frame with the murine heavy chain immunoglobulin secretory signal peptide (sp) in the pRTL202 (Carrington et al. 1991) by *KpnI/XbaI* ligation to yield secRFP. This was used as a template for subsequent constructs. The secRFP and TMCT were spliced together by fusion PCR. The coding sequence TMCT from pUni51-AtRMR1 (Arabidopsis stock) was amplified using primers 4 and 6 and secRFP with the primers 3 and 5, overlapping PCR was used to produce RFP-TMCT. In addition, secRFP control was amplified using primers 3 and 2. All PCR

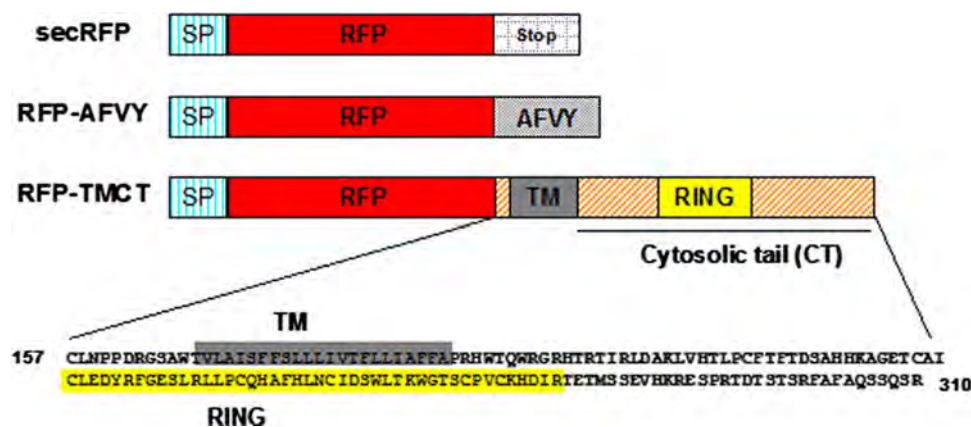
products were cloned into binary vector by Gateway (Invitrogen Argentina, SA, Buenos Aires, Argentina) recombination system with entry vector pENTR D-Topo and destination vector pGWB2 (Nakagawa et al. 2007). All the constructs were introduced into strain GV3101 of *Agrobacterium tumefaciens*. *Arabidopsis thaliana* col-0 plants were then transformed using the floral dip method (Clough and Bent 1998).

### Agrobacterium-mediated transient protein expression

Leaf abaxial epidermal cells of *Nicotiana tabacum* cv. SR1 were transformed using the Agrobacterium infiltration technique (Batoko et al. 2000; Sparkes et al. 2006). In all cases, for expression of each construct alone or in combination, the final level of inoculum was adjusted to  $DO_{600} = 0.1$  and observed 2–3 days after agroinfiltration by CLSM. Post-infiltration, the light-incubated plants were maintained at 20°C with 16 h light and 8 h dark. The constructs used in this study were as follows: ST-YFP (Brandizzi et al. 2002), spGFP-HDEL (Boevink et al. 1996),  $\gamma$ -TIP-YFP (Hunter et al. 2007), Lti6b-eGFP (Cutler et al. 2000).

### Confocal analysis and image processing

About 30 seeds from at least 4 independent transgenic lines per construct were germinated onto agar plates containing half-strength Murashige and Skoog (MS) Basal Medium (Sigma-Aldrich) and grown at 22°C, in a 16:8 light:dark regime. 8-day roots and 15-day leaves were excised, mounted on to 0.5× liquid MS medium and immediately



**Fig. 1** Schematic representation of the constructs analyzed. *secRFP* secretory RFP; *RFP-AFVY* RFP fused to the ctVSS of phaseolin storage protein, *RFP-TMCT* RFP fused to the transmembrane (TM) and cytosolic tail (CT) of AtRMR1. The polypeptide sequence of TMCT fused to RFP is shown (amino acid residues 157–310 of

AtRMR1, AAF32325). The TM was predicted by the server <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM> (residues 168–190 of full-length AtRMR1); RING: RING-finger Domain was predicted with Prosite (residues 232–274 of full-length AtRMR1) SP signal peptide, RFP monomeric red fluorescent protein

observed with a Leica TSC SP5 confocal laser scanning microscope, using a 63× (NA 1.4) oil immersion objective. RFP was excited at 561 nm and detected in the 570–630 nm range. YFP was excited at 514 nm and detected in the 525–559 nm range. GFP was excited at 488 nm and detected in the 496–532 nm range. Simultaneous detection of RFP and YFP or GFP was performed by combining the settings indicated above in the sequential scanning facility of the microscope, as instructed by the manufacturer.

Total cell protein extracts, microsomes and vacuoles isolation from Arabidopsis transgenic leaves and Western blot analysis

Arabidopsis transgenic leaves expressing RFP-TMCT, RFP-AFVY and *wild type* as control were homogenized using a cold mortar and pestle in Suc buffer (100 mM Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane]–HCl, pH 7.5, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, and 12% [w/w] Suc). The homogenate was centrifuged for 5 min at 1,000g to remove debris and intact cells. The supernatant was loaded on top of a 17% (w/w) Suc pad and centrifuged for 30 min at 150,000g in an SW41 Ti rotor (Beckman Instruments, Fullerton, CA) 4°C. The supernatant, the soluble fraction, containing cytosolic and vacuolar proteins was removed and the microsomal pellet was resuspended in Suc buffer, in Suc buffer containing 1 M NaCl, or in 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. After 30 min of incubation on ice, the microsome suspensions were reloaded on top of a 17% (w/w) Suc pad and centrifuged for 30 min at 150,000g. Supernatants and pellets were homogenized in 100 mM Tris–Cl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% (v/v) Triton X-100, pH 7.5, supplemented with protease inhibitor cocktail (Complete, Boehringer Mannheim). Samples were denatured with Laemmli buffer, loaded on to reducing SDS-PAGE (CBS System) and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Polyscreen®, Perkin–Elmer, Boston, MA, USA). Blot was first incubated with rabbit serum specific to RFP (1:2000 dilution, Rabbit Polyclonal IgG, ABR) and then with peroxidase conjugate secondary rabbit immunoglobulin G specific antibody (1:2000 dilution, Sigma). Immunodetection was performed using the enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham) following the manufacturers protocol.

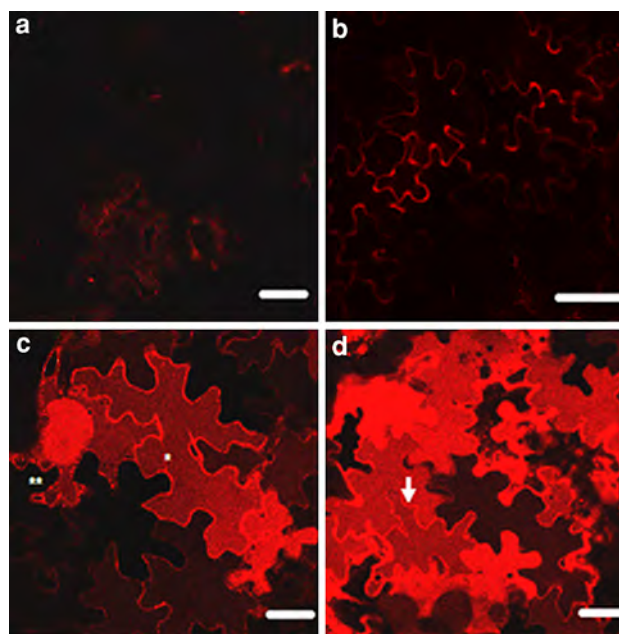
Transgenic Arabidopsis plants expressing RFP-TMCT were grown on soil and rosette leaves were digested using cell wall-digesting enzymes, and intact protoplasts were isolated according to the method of Wu et al. (2009) and vacuoles were isolation from protoplasts according to Robert et al. (2007). The vacuolar fraction quality has been examined using immunoblot analysis indicating that the fraction was not contaminated.

## Results

RFP-TMCT reporter labels the lumen of central vacuoles in transient expression in *N. tabacum* leaves

To test if the sequence encoding the TM and CT domains of AtRMR1 is sufficient to direct a reporter protein to vacuoles, a fusion of this sequence to mRFP (monomeric red fluorescent protein) was constructed. The reporter mRFP was chosen because of its ability to fluoresce at the low pH of vacuoles (Shaner et al. 2005; Samalova et al. 2006). To guarantee translocation into the lumen of the endoplasmic reticulum, a sequence encoding an immunoglobulin heavy chain signal peptide (sp) was fused to the N-terminus of RFP (RFP-TMCT, Fig. 1). A control consisting of a secretory version of RFP (secRFP, Fig. 1) composed by a signal peptide and RFP alone was also generated. The constitutive enhancer cauliflower mosaic virus 35S (CaMV 35S) promoter was used in all cases.

Transient expression of these constructs by agroinfiltration (Sparkes et al. 2006) was performed in tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf epidermal cells (Fig. 2). Leaves were observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Fluorescence in the apoplast was observed for secRFP (Fig. 2b) indicating secretion and confirming that



**Fig. 2** RFP-TMCT reporter labels the vacuolar lumen in leaf epidermal cells of *Nicotiana tabacum*. **a** Negative control: agroinfiltration medium alone. **b** secRFP reporter showed an apoplastic pattern. **c** RFP-AFVY reporter highlights the vacuolar lumen and cortical ER (\*\*), and transvacuolar strands (\*). **d** RFP-TMCT reporter showed a vacuolar lumen and cortical ER pattern (arrow). Scale bars 50 μm

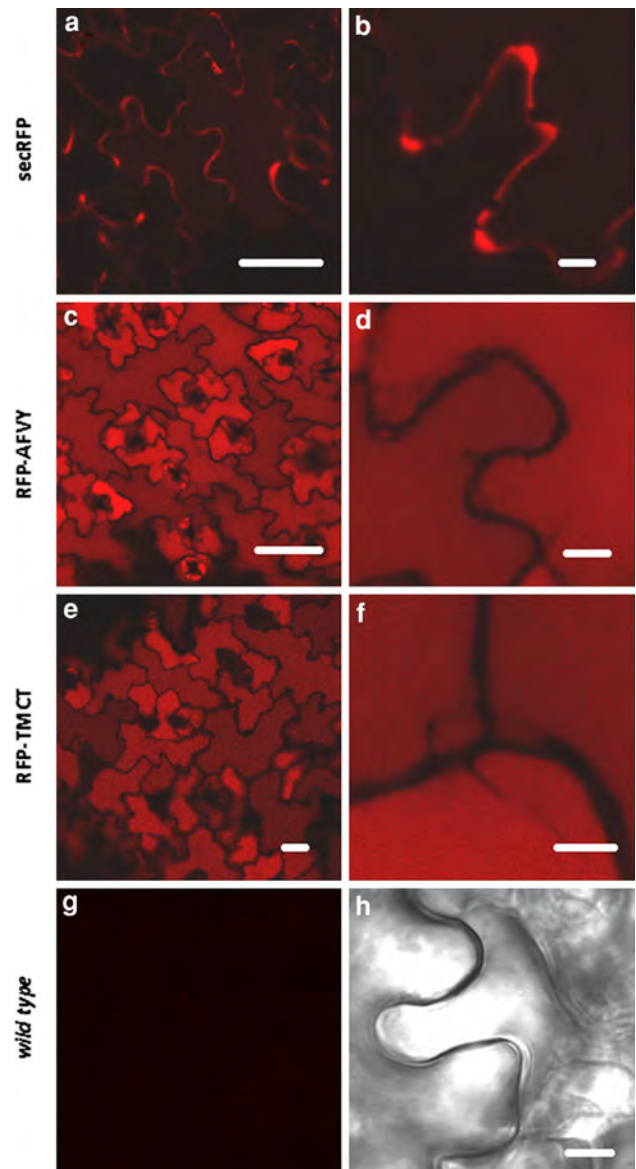
the heterologous signal peptide is working properly. As a positive control, the vacuolar reporter RFP-AFVY that contains a ctVSS (Frigerio et al. 1998) was used (RFP-AFVY, Fig. 1). RFP-AFVY was found mainly in the lumen of the central vacuole (Fig. 2c) as described previously (Hunter et al. 2007). In addition, RFP-AFVY was also detectable in the cortical ER, especially in high-expressing cells (Fig. 2c, double asterisks). This result evidences the traffic of RFP-AFVY through the endomembrane system to reach the final destination in the vacuole. The expression of RFP-TMCT reporter gave rise to strong labeling of the lumen of the central vacuole (Fig. 2d), and not tonoplast label, as expected from the presence of the TM domain. In some high-expressing cells, the cell periphery was also highlighted, possibly reflecting the cortical ER (Fig. 2d, arrow; see further below).

TM and CT of AtRMR1 are able to deliver RFP in the lumen of central vacuoles in leaves, roots and embryos of *Arabidopsis thaliana* transgenic plants

The expression patterns of RFP-tagged constructs were evaluated in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants by CLSM. To this end, leaves from 15-day-old seedlings expressing individual RFP-tagged reporters were analyzed (Fig. 3). secRFP was found in the apoplast (Fig. 3a, b). RFP-AFVY and RFP-TMCT were exclusively localized in the lumen of the large, central vegetative vacuoles (Fig. 3c–e). At a higher magnification, both RFP-AFVY and RFP-TMCT were mostly detected in the vacuolar lumen and no labeling in the tonoplast, or indeed other endomembranes, was apparent (Fig. 3d–f). Since secRFP is secreted, the label of RFP-TMCT reporter into the vacuolar lumen is indicative of a specific role of the TMCT domain in redirecting the protein from the default secretion pathway.

In root axes from transgenic RFP-TMCT and RFP-AFVY seedlings showed a strong red fluorescent signal in the vacuolar lumen (Fig. 4), while no fluorescent signal was detected in *wild type* roots. These results indicate that the TMCT vacuolar sorting signal functions both in roots and leaf, as does AFVY (Hunter et al. 2007).

Transgenic embryos dissected from dry seeds of transgenic lines expressing RFP-TMCT and RFP-AFVY constructs, and *wild type* seeds as negative controls, were also analyzed (Fig. 4). Once again, in mature embryos, the common fluorescence pattern for RFP-AFVY and RFP-TMCT proteins was the lumen of the PSV. RFP-TMCT showed the same distribution as RFP-AFVY (Hunter et al. 2007; Craddock et al. 2008), which differs from *wild type* seeds and it is clearly a PSV pattern. This finding indicates that TMCT domains of AtRMR1 can also sort reporter

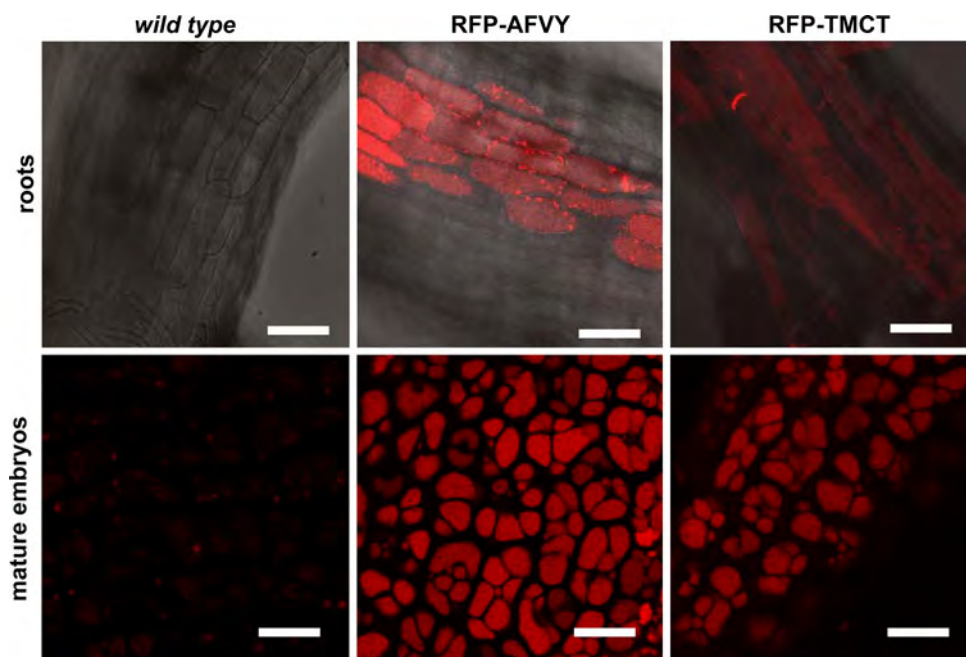


**Fig. 3** RFP-TMCT reporter labels the vacuolar lumen in transgenic leaf epidermal cells of *Arabidopsis thaliana*. Leaves from transgenic plants expressing the indicated constructs were analyzed by confocal microscopy. RFP was excited at 561 nm. All images shown were acquired using the same photomultiplier gain and offset settings. For each sample, two magnifications are shown. Scale bars 30  $\mu$ m (a, c and e) and 5  $\mu$ m (b, d, f, g and h)

proteins to seed PSVs and suggest that, in principle, these domains could be used to deliver proteins of interest to PSV lumen in seeds.

Because RFP-TMCT and RFP-AFVY reporter have the same distribution pattern in seeds and vegetative tissues of transgenic *Arabidopsis thaliana*, we conclude that the transmembrane domain and cytosolic tail of RMR are able to deliver RFP to the vacuolar lumen in all cell types analyzed, in a manner similar to the soluble ctVSS, AFVY.

**Fig. 4** RFP-TMCT reporter labels the vacuolar lumen in roots and mature embryos of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. Two vacuole-targeted RFP reporters localize to the same vacuole in *Arabidopsis* roots and embryos. RFP was excited at 561 nm. All images shown were acquired using the same photomultiplier gain and offset. Scale bars 50  $\mu$ m in roots and 10  $\mu$ m in embryos



RFP-TMCT behaves as an integral membrane protein associated to microsomes membranes

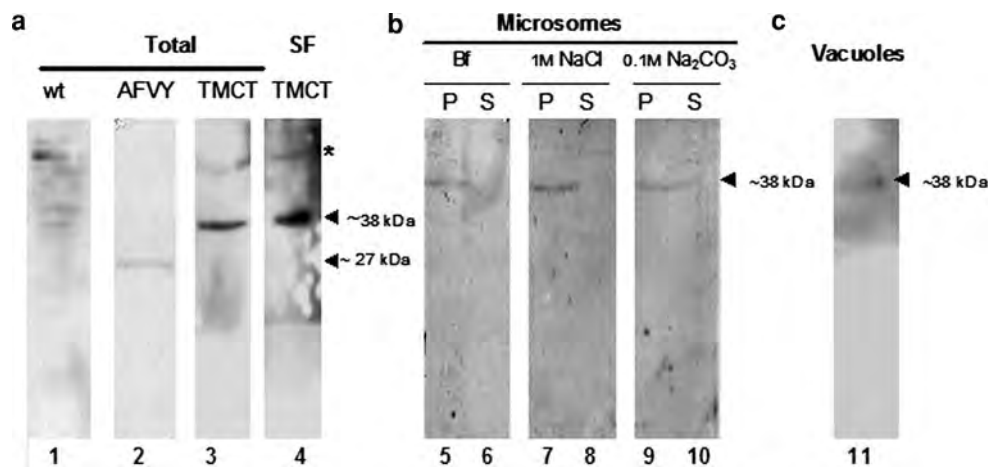
Sorting of membrane proteins is still an open question in plant cells (Barrieu and Chrispeels 1999). To verify whether the TM domain used in the reporter RFP-TMCT is inserted into the ER membrane during its synthesis, microsomes were prepared from transgenic *A. thaliana* leaves expressing RFP-TMCT (Fig. 5) as previously described (Frigerio et al. 2000). Immunoblots of total protein extracts from transgenic *Arabidopsis* leaves expressing RFP-AFVY and RFP-TMCT with RFP antiserum presented a band of 27 and 38 kDa, respectively (Fig. 5, lanes 2 and 3). The 38 kDa protein has the expected size for the fusion RFP (23 kDa)-TMCT (15 kDa). The soluble fraction (Fig. 5, lane 4), that contains cytosolic proteins and the content of vacuoles which is released during homogenation under these conditions, also shows a band of 38 kDa and reveals a band corresponding to full-length RFP-TMCT which may indicate that the reporter is internalized into the vacuole, rather than the RFP moiety being cleaved and separately delivered to the vacuole. To study the association of RFP-TMCT with microsome membranes, the microsomal pellet was resuspended in different buffers: Suc buffer alone as control, Suc buffer containing 1 M NaCl (to release proteins peripherally attached to the cytosolic face of microsomes) and 0.1 M sodium carbonate [to release proteins tightly bound to the membrane but not integral membranes proteins that remained associated (Fujiki et al. 1982)]. Both soluble and pellet fractions were analyzed by SDS-PAGE

followed of Immunoblot with RFP antibody. Consistently, RFP-TMCT full-length protein (38 kDa) was recovered in the microsomal fraction (Fig. 5, lanes 5–10) and remained in the pellet fraction after the treatments with Suc Bf, sodium chloride and sodium carbonate. This is consistent with RFP-TMCT being an integral membrane protein for as long as it is within microsomes (Fig. 5, lane 9). These results indicate that RFP-TMCT reporter inserts into the ER membrane but is then delivered to the vacuolar lumen without undergoing proteolytic cleavage (Figs. 3, 4). The TMCT signal is therefore sufficient to sort secRFP to vacuoles. A vacuolar fraction from RFP-TMCT transgenic *Arabidopsis* plants also exhibit a 38 kDa recognized by RFP antibody what indicate that the full-length RFP-TMCT reached the vacuoles without undergoing proteolytic cleavage (Fig. 5, lane 11).

RFP-TMCT reporter partially colocalizes with an ER marker, but not with later secretory pathway markers

To further investigate the transport of RFP-TMCT in the secretory pathway, and resolve the localization at the cell periphery observed in tobacco epidermal cells (Fig. 2d), colocalization studies with markers of the endomembrane system were carried out (Figs. 6, 7). Leaves of *N. tabacum* were co-agroinfiltrated with RFP-TMCT reporter plus a secretory pathway marker and then doubly transformed epidermal cells were selected based on the presence of both fluorescent markers.

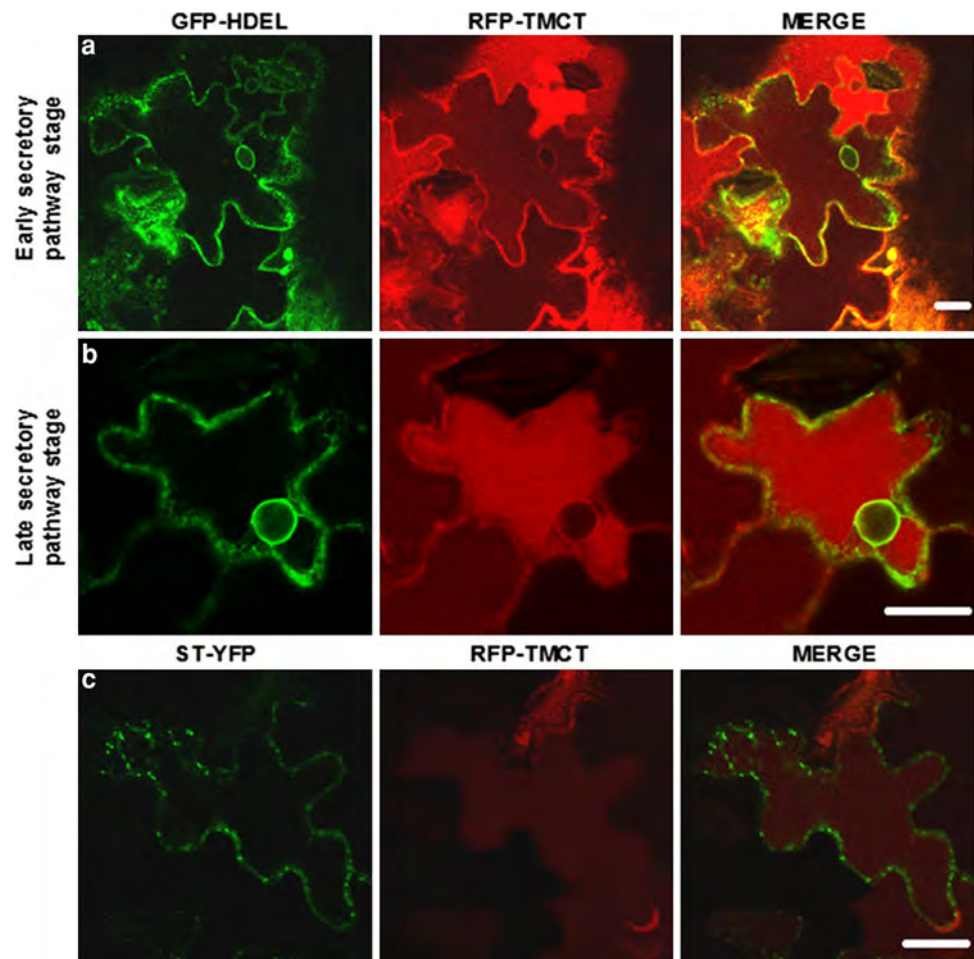
Co-agroinfiltration of RFP-TMCT and endoplasmic reticulum (ER) marker (GFP-HDEL) was performed



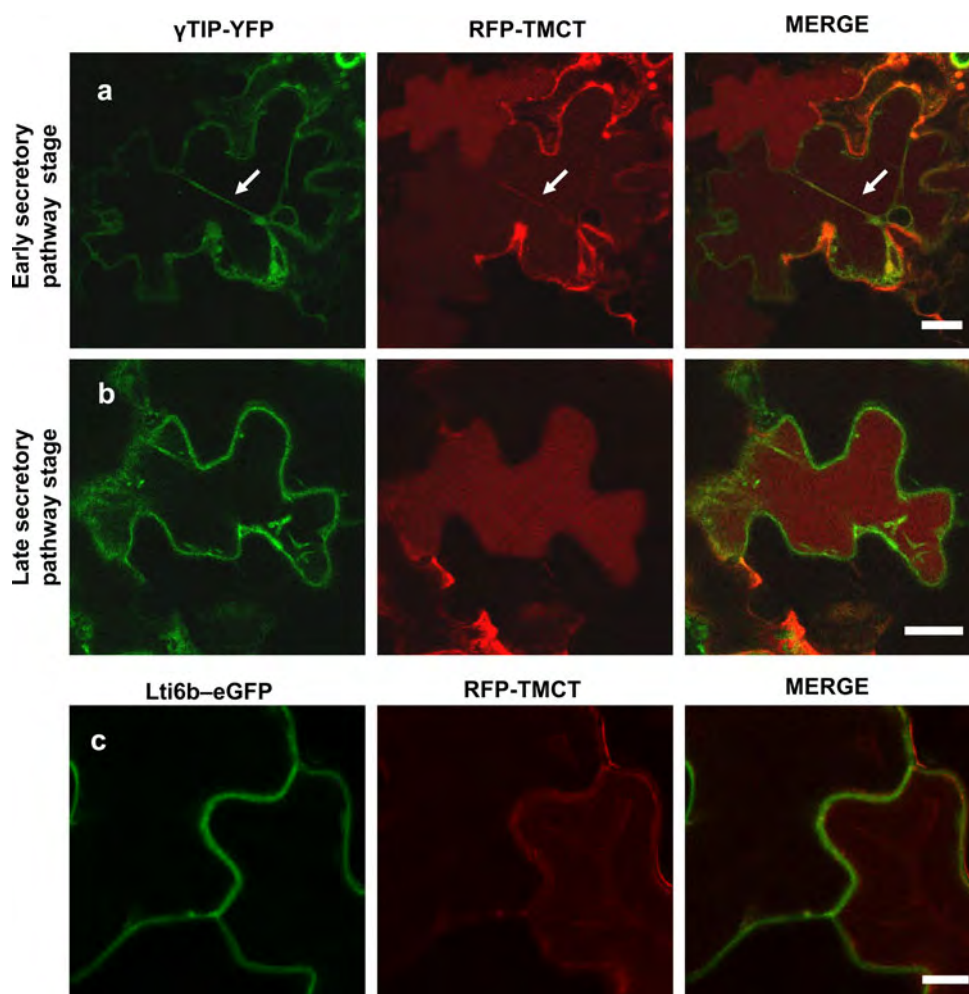
**Fig. 5** RFP-TMCT reporter behaves as an integral membrane protein. Western blot with RFP antiserum (reducing SDS-PAGE): **a** Total cell homogenate from *Arabidopsis thaliana* leaves from *wild type* (lane 1) and transgenic expressing RFP-AFVY (lane 2) and RFP-TMCT (lane 3) plants. *SF* soluble fraction, supernatant from the first microsome preparation, containing cytosolic and vacuolar proteins from RFP-TMCT transgenic arabidopsis plants. **b** Microsomes pellet were obtained from transgenic *Arabidopsis thaliana* leaves expressing RFP-TMCT reporter and to analyze associations with membranes,

microsome fraction was treated with Suc buffer, Suc buffer with 1 M NaCl or in 0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . After these treatments, soluble proteins (*S*) were separated from insoluble (*P* pellets). RFP-TMCT is found in microsomes pellets (lanes 5, 7 and 9) and is not released by sodium chloride (lane 8) either sodium carbonate (lane 10) indicated its association as an integral membrane proteins. **c** Vacuole extract from RFP-TMCT arabidopsis plants (lane 11). *Solid arrowhead* RFP-TMCT full-length fusion protein, *asterisk* endogenous arabidopsis protein detected by RFP antiserum

**Fig. 6** RFP-TMCT colocalizes with ER but not with Golgi marker. Co-Agroinfiltration studies of RFP-TMCT with GFP-HDEL (ER marker). **a** Very few cells showed an early secretory pathway stage of red reporter and colocalization with ER marker was found, as merged images showed. **b** In most cells, were found a late secretory pathway stage where the reporter RFP-TMCT was in its final destination in the vacuolar lumen, without colocalization pattern with ER marker. **c** Co-agroinfiltration study of RFP-TMCT reporter with ST-YFP (trans-Golgi marker) and no colocalization pattern was found. *Scale bars* 25  $\mu\text{m}$



**Fig. 7** RFP-TMCT does not colocalize with tonoplast and plasma membrane markers. Co-agroinfiltration studies of RFP-TMCT with  $\gamma$ TIP-YFP (tonoplast marker). **a** Cells in early secretory pathway stage of red reporter, observing transvacuolar strand labeling (*arrow*), but no tonoplast colocalization pattern, as merged images showed. **b** Cells in late secretory pathway stage showed no colocalization of the markers, with a full localization of RFP-TMCT reporter in the vacuolar lumen. Co-agroinfiltration studies of RFP-TMCT reporter with Lti6b-eGFP (plasma membrane marker). **c** Non co-localization pattern was found. *Scale bars* 25  $\mu$ m (**a**, **b**) and 10  $\mu$ m (**c**)



(Fig. 6a, b). The ER marker highlighted the characteristic reticular pattern and the nuclear envelope. Colocalization with RFP-TMCT was observed (Fig. 6a, merged panel), mainly in cells with lower accumulation of RFP-TMCT in the vacuolar lumen. This likely indicates that the chimeric protein RFP-TMCT is still in transit through the early secretory pathway. Partial ER localization was also often detected for RFP-AFVY (Fig. 2c, asterisks).

When cells were observed at a later time from infiltration, the majority of red fluorescence was indeed detectable mainly in the vacuolar lumen (Fig. 6b), with little colocalization with the ER marker still visible at the nuclear envelope (Fig. 6b, merged panel).

To study if RFP-TMCT reporter is delivered via the Golgi complex, co-agroinfiltration experiments with the Golgi marker, sialyl transferase, fused to YFP (ST-YFP), were performed (Fig. 6c). No obvious colocalization was observed between RFP-TMCT and the Golgi marker.

In addition, to test if RFP-TMCT localized in tonoplast co-agroinfiltrations with the  $\gamma$ -TIP-YFP tonoplast marker (Hunter et al. 2007) were performed. In these experiments, two different patterns corresponding to different expression

stages were observed too. The first one, cells with markers still in the early secretory pathway, showed a predominantly ER localization for  $\gamma$ -TIP-YFP, that co-localized with RFP-TMCT in the nuclear envelope and a transvacuolar strand, indicative of ER (Fig. 7a, arrow). RFP-TMCT transvacuolar strands were also observed with RFP-AFVY (Fig. 2c, asterisk). No colocalization of RFP-TMCT and  $\gamma$ -TIP-YFP was found at the tonoplast (Fig. 7a, merged panels). The second pattern, with the reporters most likely at their final destination, was found in the majority of cells. Here, no colocalization between RFP-TMCT and  $\gamma$ -TIP-YFP reporters was detected, with strong red fluorescence in the vacuolar lumen and green fluorescence in tonoplast (Fig. 7b). The absence of colocalization of RFP-TMCT with  $\gamma$ -TIP-YFP in cells in early or late secretory pathway stage suggests differences in the role of the transmembrane domain in sorting process, as discussed later.

Finally, the co-expression of RFP-TMCT with Lti6b-eGFP, a plasma membrane marker, was performed. In epidermal cells, a typical plasma membrane pattern is observed in the green channel (Fig. 7c, plasma membrane marker-GFP). Adjacent cells expressing RFP-TMCT

reporter showed red fluorescence in the vacuolar lumen (Fig. 7c, red channel) and no colocalization was found between these two makers (Fig. 7c, merged channel). This result clearly indicates that the TM of AtRMR1 does not target the RFP to the plasma membrane.

## Discussion

Transmembrane and cytosolic domains of AtRMR1 by itself behaves as a vacuolar sorting signal

Using transient expression in tobacco leaves cells and stable expression in transgenic Arabidopsis plants, we showed that the fusion of secRFP to transmembrane domain and cytosolic tail (TMCT) of AtRMR1 is sufficient to redirect this reporter protein to vacuoles. The distribution pattern of RFP-TMCT in leaves, roots and embryo of transgenic Arabidopsis was similar to that obtained for the two soluble vacuolar markers RFP-AFVY and spL-RFP (Hunter et al. 2007). In contrast, fusions of spGFP to TMCT of AtVSRs mainly accumulated in prevacuolar compartments both tobacco leaf epidermal cells (Kotzer et al. 2004; DaSilva et al. 2005) and also transgenic BY2 cells (Miao et al. 2006). In addition, the RFP-TMCT distribution pattern obtained is consistent with the immunolocalization studies performed in arabidopsis embryos that shown that—although both AtRMR1 and AtVSR1 are present in prevacuolar compartment—only AtRMR protein reaches the protein storage vacuoles (Hinz et al. 2007; Wang et al. 2011). The presented results support the different steady-state localization predicted for RMR versus the VSR family.

As was previously described, AtRMR2 protein was first localized as component of the membrane-containing crystalloid in tobacco and tomato seed PSV (Jiang et al. 2000) and DIP-positive organelle in transient expression *A. thaliana* leaf protoplasts (Park et al. 2005). Temporal expression assays using tobacco suspension culture cells showed that a reporter protein (mutated proaleurain on vacuolar targeting sequence) containing the TM and CT domains of AtRMR2 is found associated with cell membranes and traffics via the Golgi apparatus to reaches vacuoles as showed on total protein extracts from isolated vacuoles (Jiang et al. 2000). Here, we show that RFP-TMCT behaved as integral membrane protein and its final destination is the lumen of central vegetative vacuoles in leaves, roots and protein storage vacuoles in seeds from transgenic tissues. Park et al. (2005) showed that in Arabidopsis leaf protoplasts, AtRMR1 $\Delta$ LU-HA mutant gave only a minor portion of positive punctate stains that colocalized DIP organelle and the majority overlapped with Golgi marker and also the mutant AtRMR1 $\Delta$ CT-HA,

which suggest that both luminal domain and the cytoplasmic tail are important for the localization of AtRMR1-HA to the DIP-positive organelle. In contrast, RFP-TMCT in both transient assays and transgenic Arabidopsis plants is found exclusively in the lumen of central vegetative vacuoles in leaves, roots and protein storage vacuoles in seeds. Because secRFP is secreted, the TMCT is sufficient to redirect the reporter protein to vacuoles. Western blot analysis on total protein extracts and soluble fraction of transgenic leaves showed that RFP-TMCT remains intact, thus making cleavage and vacuolar sorting of soluble RFP from the reporter unlikely. Confocal observation of RFP-TMCT through the secretory pathway showed localization at ER. No obvious colocalization was observed between RFP-TMCT and the *trans*-golgi marker, but as mentioned before the reporter by Jiang et al. 2000 acquires complex modifications to asparagine-linked glycans, and could be consistent with similar localization report to AtRMR2 and cruciferin that was present at the periphery in the *cis* and medial cisternae and in DVs (Wang et al. 2011). Live cell imaging studies, revealed non tonoplast localization, consistent with findings from other studies, labeling for AtRMR2 on organelles representing PVCs was predominantly internal providing further support that these proteins are internalized during their traffic to the PSV and such internalization would remove the possibility that AtRMR2 could recycle back to the Golgi apparatus to participate in more than one round of ligand sorting (Wang et al. 2011). Finally, the results presented here show that TMCT of AtRMR1 by itself reaches the vacuoles as has been described for the full-length native receptor (Hinz et al. 2007). Nevertheless, it has been proposed that native receptor interacts with the cargo storage proteins that aggregate and trigger internalization (Wang et al. 2011). In our work, internalization seems to occur without this interaction, with a direct fusion of TMCT to a soluble reporter protein.

Taking into consideration, the limitation of transient experiments to study sorting signal because the possibilities of overload the transport machinery together with the differences in transport in the secretory pathway between different organs (Petruccioli et al. 2006; Drakakaki et al. 2006; Van Droogenbroeck et al. 2007) our results show that TMCT can sort the reporter to vacuoles in different tissues of transgenic Arabidopsis. No secretion was detected as has been observed for other vacuolar protein expressed in seeds (Petruccioli et al. 2006; Chiera et al. 2004; Drakakaki et al. 2006).

Based on the results presented here, we propose that the TMCT domain could be used to sort protein of interest to vacuoles, avoiding the requirement of interaction between the cargo protein and the receptor, which is limited by the affinity of the receptor for its target and it is susceptible of

saturation. We have previously observed a similar phenomenon when a full-length antibody fused to a KDEL signal was expressed in tobacco seeds (Petruccioli et al. 2006). We are currently testing whether the TMCT fusion strategy is more efficient than the use of VSS dependent of receptor proteins.

## Conclusion

This work present a heterologous protein expression strategy based on Arabidopsis receptor homology-transmembrane-RING H2 domains. RFP with the signal of TM and CT of AtRMR1 reaches the lumen vacuolar in all tissue and species evaluated providing new experimental data with the use of a fluorescent reporter fluorescent at the low pH of vacuoles.

**Acknowledgments** We thank Dr. Chris Hawes (Oxford Brookes) for providing spGFP-HDEL, Dr. Erik L. Snap (National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda) for providing pcDNA3.1-mRFP and Dr. Tsuyoshi Nakagawa (Shimane University) for providing Gateway binary vectors. Also, Dr. Laura Garcia (IBBM-FCEUNLPCONICET) and Dana Martinez (INFIVE-UNLPCONICET) for technical support with the ultracentrifuge equipment and vacuole isolation, respectively. This research was supported by the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) through the grant PICT38048 to Petruccioli Silvana and by the Universidad Nacional de La Plata by a travel grant to Camila María Scabone. Petruccioli Silvana is member of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET). Camila María Scabone was ANPCyT PhD fellow and currently is PhD fellows of CONICET.

## References

- Ahmed SU, Bar-Peled M, Raikhel NV (1997) Cloning and subcellular location of an Arabidopsis receptor-like protein that shares common features with protein-sorting receptors of eukaryotic cells. *Plant Physiol* 114:325–336
- Barrieu F, Chrispeels MJ (1999) Delivery of a secreted soluble protein to the vacuole via a membrane anchor. *Plant Physiol* 120:961–968
- Batoko H, Zheng HQ, Hawes C, Moore I (2000) A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *Plant Cell* 12:2201–2218
- Benchabane M, Goulet C, Rivard D, Faye L, Gomord V, Michaud D (2008) Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnol J* 6:633–648
- Boevink P, SantaCruz S, Hawes C, Harris N, Oparka KJ (1996) Virus-mediated delivery of the green fluorescent protein to the endoplasmic reticulum of plant cells. *Plant J* 10(5):935–941
- Brandizzi F, Snapp E, Roberts A, Lippincott-Schwartz J, Hawes C (2002) Membrane protein transport between the ER and Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independence: evidence from selective photobleaching. *Plant Cell* 14:1293–1309
- Carrington JC, Freed DD, Leinicke AJ (1991) Bipartite signal sequence mediates nuclear translocation of the plant polyviral N1a protein. *Plant Cell* 3:953–962
- Chiera JM, Grabau EA, Finer JJ (2004) Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability. *Plant Mol Biol* 56:895–904
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735–743
- Craddock C, Hunter P, Szakacs E, Hinz G, Robinson D, 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
- Cutler SR, Ehrhardt DW, Griffiths JS, Somerville CR (2000) Random GFP:cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3718–3723
- DaSilva LL, Taylor JP, Hadlington JL, Hanton SL, Snowden CJ, Fox SJ, Foresti O, Brandizzi F, Denecke J (2005) Receptor salvage from the prevacuolar compartment is essential for efficient vacuolar protein targeting. *Plant Cell* 17:132–148
- DaSilva LLP, Foresti O, Denecke J (2006) Targeting of the plant vacuolar sorting receptor BP80 is dependent on multiple sorting signals in the cytosolic tail. *Plant Cell* 18(6):1477–1497
- Denecke J, Botterman J, Deblaere R (1990) Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway. *Plant Cell* 2:51–59
- Drakakaki G, Marcel S, Arcalis E, Altmann F, 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
- Faye L, Gomord V (2010) Success stories in molecular farming: a brief overview. *Plant Biotechnol J* 8:525–528
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman R (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* 7:152–158
- Frigerio L, Virgilio MD, Prada A, Faoro F, Vitale A (1998) Sorting of phaseolin to the vacuole is saturable and requires a short C-terminal peptide. *Plant Cell* 10:1031–1042
- Frigerio L, Vine ND, Pedrazzini E, Hein MB, Wang F, Ma JKC, Vitale A (2000) Assembly, secretion and vacuolar delivery of a hybrid immunoglobulin in plants. *Plant Physiol* 123:1483–1493
- Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 93:97–102
- Gillespie JE, Rogers SW, Deery M, Dupree P, Rogers JC (2005) A unique family of proteins associated with internalized membranes in protein storage vacuoles of the Brassicaceae. *Plant J* 41:429–441
- Herman EM, Larkins BA (1999) Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* 11:601–614
- Hinz G, Colanesi S, Hillmer S, Rogers JC, Robinson DG (2007) Localization of vacuolar transport receptors and cargo proteins in the Golgi apparatus of developing Arabidopsis embryos. *Traffic* 8:1452–1464
- Holkeri H, Vitale A (2001) Vacuolar sorting determinants within a plant storage protein trimer act cumulatively. *Traffic* 2:737–741
- Hunter PR, Craddock CP, Di Benedetto S, Roberts LM, Frigerio L (2007) Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in Arabidopsis cells. *Plant Physiol* 145:1371–1382
- Jiang L, Phillips TE, Rogers SW, Rogers JC (2000) Biogenesis of the protein storage vacuole crystalloid. *J Cell Biol* 150:755–769
- Jolliffe NA, Craddock CP, Frigerio L (2005) Pathways for protein transport to seed storage vacuoles. *Biochem Soc Trans* 33(5):1016–1018



- 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
- Ma JKC, Barros E, Bock R, Christou P, Dale PJ, Dix PJ, Fischer R, Irwin J, Mahoney R, Pezzotti M, Schillberg S, Sparrow P, Stoger E, Twyman RM (2005) Molecular farming for new drugs and vaccines: current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Rep* 6:593–599
- Maruyama N, Mun LC, Tatsuhara M, Sawada M, Ishimoto M, Utsumi S (2006) Multiple vacuolar sorting determinants exist in soybean 11S globulin. *Plant Cell* 18:1253–1273
- Matsuoka K, Nakamura K (1999) Large alkyl side-chains of isoleucine and leucine in the NPRL region constitute the core of the vacuolar sorting determinant of sporamin precursor. *Plant Mol Biol* 41:825–835
- Matsuoka K, Neuhaus J (1999) Cis-elements of protein transport to the plant vacuoles. *J Exp Bot* 50:165–174
- Miao Y, Yan PK, Kim H, Hwang I, Jiang L (2006) Localization of green fluorescent protein fusions with the seven *Arabidopsis* vacuolar sorting receptors to prevacuolar compartments in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol* 142:945–962
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* 104(1):34–41
- Neuhaus J, Rogers J (1998) Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol Biol* 38:127–144
- Neuhaus J-M, Sticher L, Meins F Jr, Boller T (1991) A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10362–10366
- Paris N, Neuhaus JM (2002) BP-80 as a vacuolar sorting receptor. *Plant Mol Biol* 50:903–914
- Paris N, Rogers SW, Jiang L, Kirsch T, Beevers L, Phillips TE, Rogers JC (1997) Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Physiol* 115:29–39
- Park M, Lee D, Lee G-J, Hwang I (2005) AtRMR1 functions as a cargo receptor for protein trafficking to the protein storage vacuole. *J Cell Biol* 170(5):757–767
- Park JH, Oufattole M, Rogers JC (2007) Golgi-mediated vacuolar sorting in plant cells: RMR proteins are sorting receptors for the protein aggregation/membrane internalization pathway. *Plant Sci* 172:728–745
- Petruccioli S, Otegui MS, Lareu F, Tran Dinh O, Fitchette AC, Circosta A, Rumbo M, Bardor M, Carcamo R, Gomord V, Beachy RN (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 Biotechnol J* 4:511–527
- Petruccioli S, Molina MI, Lareu FJ, 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 Physiol Biochem* 45:400–409
- Robert S, Zouhar J, Carter C, Raikhel N (2007) Isolation of intact vacuoles from *Arabidopsis* rosette leaf-derived protoplasts. *Nat Protoc* 2:259–262
- Saint-Jean B, Seveno-Carpentier E, Alcon C, Neuhaus JM, Paris N (2010) The cytosolic tail dipeptide Ile-Met of the pea receptor BP80 is required for recycling from the prevacuole and for endocytosis. *Plant Cell* 22(8):2825–2837
- Samalova M, Fricker M, Moore I (2006) Ratiometric fluorescence-imaging assays of plant membrane traffic using polyproteins. *Traffic* 1701–1723
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2:905–909
- Shimada T, Fuji K, Tamura K, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I et al (2003) Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(26):16095–16100
- Snapp EL, Sharma A, Lippincott-schwartz J, Hegde RS (2006) Monitoring chaperone engagement of substrates in the endoplasmic reticulum of live cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(17):6536–6541
- Sparkes IA, Runions J, Kearns A, Hawes C (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc* 1(4):2019–2025
- Stoger E, Ma JK-C, Fischer R, Christou P (2005) Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Curr Opin Biotechnol* 16:167–173
- Van Droogenbroeck B, Cao J, Stadlmann J, Altmann F, Colanesi S, Hillmer S, Robinson DG, Van Lerberge E, Terryn N, Van Montagu M, Liang M, Depicker A, De Jaeger G (2007) Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic *Arabidopsis* seeds. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1430–1435
- Vitale A, Hinz G (2005) Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *Trends Plant Sci* 10:316–323
- Vitale A, Raikhel NV (1999) What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends Plant Sci* 4:149–155
- Wang H, Rogers JC, Jiang L (2011) Plant RMR proteins: unique vacuolar sorting receptors that couple ligand sorting with membrane internalization. *FEBS J* 278:59–68
- Wu FH, Shen SC, Lee LY, Lee SH, Chan MT, Lin CS (2009) Tape-*Arabidopsis* Sandwich—a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods* 5:16
- Zouhar J, Rojo E (2009) Plant vacuoles: where did they come from and where are they heading? *Curr Opin Plant Biol* 12:677–684
- Zouhar J, Muñoz A, Rojo E (2010) Functional specialization within the vacuolar sorting receptor family: VSR1, VSR3 and VSR4 sort vacuolar storage cargo in seeds and vegetative tissues. *Plant J*. doi:10.1111/j.1365-3113X.2010.04349.x

*Lic. Camila María Scabone | Directora: Dra. Silvana petruccelli*

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

2012