



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral***

***"Estrategias para incrementar la producción de  
transglutaminasa tisular humana en *Nicotiana  
benthamiana*"***

---

***Tesista: Lic. Vanesa Soledad Marin Viegas***

***Directora: Dra. Silvana Petrucelli***

***Año 2017***

**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 Criotecología de Alimentos (CIDCA, UNLP-CONICET CCT La Plata), bajo la dirección de la Dra. Silvana Petruccelli.  
La Plata, 2017**

## **Agradecimientos**

A la Dra. Silvana Petruccelli, por confiar en mí para para realizar este trabajo, por haberme ayudado en la redacción del mismo y por tantas charlas ajenas al trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por permitirme realizar el doctorado en el ámbito de la institución.

Al CIDCA, por brindarme el espacio y los recursos que me permitieron desarrollar el doctorado. A toda su gente, directivos, investigadores, becarios y técnicos.

A los proteicos de antes y a los de ahora, Yani, Santi, Agus N., Anita, Ale, Paula (por las incontables veces que le pregunté y pedí cosas), ex-proteica Elena (gracias por alegrar el CIDCA durante tu estadía), Luciana, Cristian, Charly, Ceci C., Agus B., Juli, Ceci O., Martín, Susan, Mati, Mariela y la bella María agro-proteica. Gracias a todos por los cientos de mates y reactivos intercambiados! y de nada! (por liberarles el sucucho).

A Flavia, tan linda persona. Gracias por tu ayuda y apoyo siempre.

A los intergrantes y ex-integrantes del labo: Coqui (por sus encantadoras e inagotables bolufrases), Caro, Silvi, Fabri, Mati, Omar, Hila y Fernando.

A mis amigos de la facu, por embellecer el camino durante la carrera: Gonza, Vicky, Cin y Taty. También a las bellas kefirupotras: Marula y su poroto, Mai, Leo y Vir. A las amigas que han pasado en las diferentes etapas: Noe, Yemi y Sofi; Naty Gaby y Eli.

A mis hermanos: Nico, Flo, Juli y Ani. Por ser tan cada uno tan especial y único. Los adoro!

A mi familia entera, incondicional. En particular mis nonos, por los momentos hermosos que recuerdo con tanto cariño y los valores que nos transmitieron. Aunque nunca vean esto, los extraño mucho.

A mi mamá, una gran mujer y madre! Sos una persona maravillosa, tu alegría y calidez son únicas. Gracias por tu apoyo incondicional, por criarnos con tanto esmero y empujarnos a ser nosotros mismos.

A Nacho, por antes, por ahora y por lo que falta. Gracias por elegir cada día acompañarnos en el camino de la vida. Gracias por enseñarme a ablandar la coraza. Gracias por estar siempre.

A Iru, simplemente por existir. Con tu llegada me enseñaste lo que es amar incondicionalmente y cambiaste mi vida para siempre. Gracias por iluminar cada rincón y enseñarme cada día lo que es importante en esta vida.

A todos, muchas gracias!

## **Resumen**

La transglutaminasa tisular humana (TG2) es el principal autoantígeno de la enfermedad celíaca, por lo que resulta una molécula de interés para el diagnóstico de esta enfermedad. En este trabajo se desarrolló un sistema para producir y purificar TG2 de plantas. En el abordaje de la producción de TG2 se utilizaron dos estrategias para incrementar sus niveles de acumulación: el direccionamiento subcelular y la coexpresión con polímeros similares a elastina (ELP). Las condiciones que produjeron mayores niveles de expresión fueron obtenidas por direccionamiento a retículo endoplásmico o vacuola y en presencia de moléculas de ELP. Por otro lado, se diseñó un sistema de purificación que consiste en la producción de una molécula de captura que permite realizar una precipitación selectiva. Esta molécula está formada por un anticuerpo simple cadena específico de TG2 fusionado covalentemente a un polímero similar a elastina y se produjo en hojas de *Nicotiana benthamiana*. La molécula de captura fue capaz de reconocer y recuperar TG2 producida en plantas o de células Caco-2. Finalmente, se demostró que las versiones de TG2 producidas en plantas fueron reconocidas por sueros de pacientes celíacos mientras que no por sueros de personas sanas, indicando que podrían ser utilizadas en un método de detección de la enfermedad celíaca.

## PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS

### Artículos publicados en revistas internacionales con referato en relación a esta tesis:

- **Marin Viegas V.S.**, Acevedo G.R., Bayardo M.P., Chirido F.G. and Petruccelli S. (2015). Production of the Main Celiac Disease Autoantigen by Transient Expression in *Nicotiana benthamiana*. Front. Plant Sci. 6:1067. doi: 10.3389/fpls.2015.01067

- **Marin Viegas, V.S.**, Ocampo, C. and Petruccelli S. (2016). Vacuolar deposition of recombinant proteins in plant vegetative organs as a strategy to increase yields. Bioengineered, doi: 10.1080/21655979.2016.1222994

### Artículos publicados en revistas internacionales con referato en los que participé en paralelo al desarrollo de esta tesis:

- Ocampo, C.G., Lareu, J.F., **Marin Viegas, V.S.**, Mangano, S., Loos, A., Steinkellner, H. and Petruccelli, S. (2016). Vacuolar targeting of recombinant antibodies in *Nicotiana benthamiana*. Plant Biotechnol. J., doi: 10.1111/pbi.12580.

## PARTICIPACIÓN EN REUNIONES CIENTÍFICAS

### Comunicaciones orales:

1.: "Optimización de la producción de transglutaminasa tisular humana para ser empleada como antígeno para el diagnóstico de la enfermedad celíaca" Vanessa S. Marin Viegas, Gonzalo R. Acevedo, Fernando Chirido, Silvana Petruccelli. XII Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial-JORFYBI Argentina, 2015.

### Comunicaciones como póster:

1. "Estrategias para incrementar los niveles de acumulación de transglutaminasa tisular humana (htTG) en plantas: estudio del efecto de distintas señales de direccionamiento" Vanessa S. Marin Viegas, Silvana Petruccelli. XIV Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. Argentina, 2012.

2. "Confining human tissue transglutaminasa (htTG) into plant secretory pathway as strategy to increase protein yields." Petruccelli Silvana, Marin Viegas Vanessa S. THE FIFTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON: PLANT-BASED VACCINES, ANTIBODIES & BIOLOGICS. Italia, 2013.

3. "Incremento en la acumulación de transglutaminasa tisular humana en células vegetales a través de la coexpresión con un anticuerpo simple cadena-fusionado a un polímero similar a elastina" Vanessa S. Marin Viegas, Silvana Petruccelli. XV Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. Argentina, 2014.

4. "Subcellular targeting and induction of protein bodies as strategies to increase human transglutaminase's yields in *Nicotiana benthamiana* leaves" Vanessa S. Marin Viegas, Gonzalo R. Acevedo, Fernando Chirido, Silvana Petruccelli. 11th International Congress of Plant Molecular Biology-IPMB. Brasil, 2015.

## Índice de contenidos

Agradecimientos	i
Resumen	ii
Publicaciones del presente trabajo	iii
Índice de contenidos	iv
Abreviaturas	vii
<b>Introducción General</b>	1
1. Las plantas como biorreactores de moléculas de interés	1
2. Factores que determinan la eficiencia del proceso de producción ( <i>Upstream</i> ) de una proteína foránea	7
3. Tecnologías que apuntan a mejorar el proceso <i>Downstream</i>	14
4. La transglutaminasa tisular humana como proteína modelo	18
4.1 TG2 como indicador diagnóstico de enfermedad celíaca	18
4.2 Síntesis de TG2	21
4.3. El diagnóstico de enfermedad celíaca en Argentina	20
<b>Objetivos</b>	24
<b>Resultados</b>	26
1. Impacto de la localización subcelular de transglutaminasa tisular humana (TG2) en los rendimientos obtenidos por expresión transitoria en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	26
1.1 Fusión de TG2 a diferentes señales de direccionamiento subcelular y subclonado en un vector binario.	26
1.2 Efecto del direccionamiento en los rendimientos de TG2	31
2. Producción de una molécula que facilite la recuperación de TG2	34
2.1 Diseño y construcción de moléculas que permitan realizar una precipitación selectiva de TG2	34
2.2 Expresión de la molécula de captura scFv-ELP en hojas de <i>N. benthamiana</i>	41
3. ELP como inductor de la formación de cuerpos proteicos en el retículo endoplásmico	45
3.1 Estudio de la capacidad el ELP(V8F)36 de inducir la formación de cuerpos proteicos en el ER	46
3.2 Efecto del ELP sobre la síntesis de TG2 en hojas de <i>N. benthamiana</i>	49
3.3 Efecto del ELP en los rendimientos de la proteína recombinante	53
3.4 Efecto de la molécula de captura scFv-ELP en los rendimientos de TG2	55
4. Purificación de las moléculas fusionadas a ELP por ciclos de transición inversa	56
4.1 Análisis de la capacidad de RFP-ELP de experimentar ciclos de transición inversa (ITC)	56
4.2 Ajuste de las condiciones que producen una mayor recuperación	60

de RFP-ELP por ITC	
4.3 Purificación de scFv-ELP por ITC	63
5. Funcionalidad de scFv-ELP como molécula de captura de TG2	66
5.1 Estudio de la capacidad de scFv-ELP para reconocer TG2	66
5.2 Inmuncaptura de TG2 con el scFv-ELP	67
6. Utilidad de TG2 producida en plantas como antígeno para el diagnóstico de la enfermedad celíaca	68
<b>Discusión</b>	72
<b>Conclusión</b>	81
<b>Materiales y Métodos</b>	84
1 Materiales	84
1.1 Material biológico	84
1.1.1 Cepas bacterianas	84
1.1.2 Células humanas	84
1.1.3 Plantas	84
1.2 Medios y soluciones	85
1.2.1 Medios de cultivos para bacterias	85
1.2.2 Soluciones	85
1.2.3 Soluciones de antibióticos	86
1.3 Reactivos	86
1.4 Vectores plasmídicos y secuencias sintéticas	86
1.4.1 Plásmidos comerciales	86
1.4.2 Plásmidos construidos en nuestro laboratorio	86
1.4.3 Plásmidos cedidos por otros laboratorios	87
1.4.4 Secuencia sintética de ELP	87
1.5 <i>Primers</i>	88
1.6 Enzimas y kits enzimáticos	88
1.7 Herramientas bioinformáticas utilizadas para el análisis de las secuencias y diseño de los <i>primers</i>	89
1.8 Anticuerpos	89
2. Metodologías	90
2.1 Minipreparación de DNA plasmídico	90
2.2 Digestiones enzimáticas	90
2.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	90
2.4 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa utilizando un kit comercial	91
2.5 Reacciones de PCR	91
2.6 Clonado en el vector pENTR™/D-TOPO®	92
2.7 Clonado en el vector pCR8/GW/TOPO®	92
2.8 Recombinación sitio específica mediante el sistema Gateway (LR clonasa)	93
2.9 Transformación química de células competentes de <i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ y TOP10	93
2.10 Transformación eléctrica de células competentes de <i>E. coli</i>	94

DH5- $\alpha$ y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	
2.11 PCR de colonias	94
2.12 Agroinfiltración de plantas <i>N. benthamiana</i>	95
2.13 Extracción de proteínas en hojas de plantas	95
2.14 Cuantificación de proteínas	96
2.15 SDS-PAGE	97
2.16 Inmunoblot	98
2.17 Stripping	99
2.18 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	99
2.19 Purificación de proteínas por ciclos de transición térmica por centrifugación (cITC) o filtración (mITC)	100
2.20 Purificación de TG2 utilizando la molécula de captura scFv-ELP	101
2.21 Purificación de TG2 por cromatografía de afinidad	101
2.22 Medida de fluorescencia	102
2.23 Procesamiento de datos por densitometría del inmunoblot	102
2.24 Microscopía de disección fluorescente y microscopía de fluorescencia confocal	102
2.25 Análisis estadístico	102
<b>Bibliografía</b>	105

## Abreviaturas

Caco-2	Células de adenocarcinoma de colon humano
CaMV	Virus de mosaico de coliflor
CLSM	Microscopía confocal láser de barrido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600nm
dpi	Días postinfiltración
EC	Enfermedad celíaca
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
ELP	Polímeros similares a elastina
ER	Retículo endoplásmico
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GUS	Enzima $\beta$ -glucuronidasa
HIS	Tag de histidinas
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
HRP	Peroxidasa de rábano picante
ITC	Ciclos de transición inversa
KISIA	Señal de direccionamiento vacuolar
mAb	Anticuerpo monoclonal
MI	Medio de infiltración
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
Nos	Gen de nopalina sintasa
<i>NT-1</i>	<i>Nicotiana tabacum 1</i>
PB	Cuerpos proteicos
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMP	Plant molecular pharming
PTGS	Supresores virales de silenciamiento génico postranscripcional
RFP	Proteína Roja Fluorescente
RLS	Subunidad grande de la RuBisCO
scFV	Anticuerpo simple cadena
SDA-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturalizante
SEKDEL	Señal de retención en ER
SP	Péptido señal
Ta	Temperatura para inducir la agregación
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
TG2	Transglutaminasa tisular humana
TMB	Tetrametilbenzidina
TSP	Proteínas totales solubles
Tt	Temperatura de transición teórica
UA	Unidades arbitrarias
USDA	Departamento de Agricultura de Estados Unidos
UTRs	Regiones no traducidas

*Introducción*

## 1. Las plantas como biorreactores de moléculas de interés

El uso de las plantas como biorreactores para producir moléculas de interés incluyendo proteínas recombinantes se denomina “*plant molecular pharming (PMP)*” (Ma y col. 2015). Las plataformas PMP en comparación con otros sistemas que emplean células de mamíferos, bacterias y levaduras, presentan numerosas ventajas, como por ejemplo los bajos costos de producción y de inversión en instalaciones para la manufactura, facilidad en la introducción en los genes de interés y la simplicidad y rapidez del escalado (Fischer y col. 2012; Sack y col. 2015). Además, las plantas carecen de endotoxinas como las encontradas en bacterias y no son huéspedes de patógenos animales por lo resultan ser un sistema más seguro. Asimismo debido a las diferencias fisiológicas entre animales y vegetales, se podrían producir un gran número de proteínas como hormonas y factores de crecimiento sin correr el riesgo de que interfieran en el desarrollo normal del sistema. Otra ventaja que presentan las plantas es que tienen la capacidad de procesar correctamente proteínas de estructura compleja ya que glicosilan, hidroxilan, fosforilan, forman uniones disulfuro, realizan procesamiento proteolítico, etc. (Ma y col. 2013; Gomord y Faye 2004). La principal desventaja que presentaban las plataformas PMP eran los niveles de expresión alcanzados, que eran inferiores a los obtenidos en otros sistemas, sin embargo, este obstáculo fue superado con numerosas mejoras que se describirán más adelante.

En cuanto a la transformación de las células vegetales, se dispone de sistemas estables y transitorios. En los sistemas de transformación estable los genes foráneos se introducen en el genoma nuclear o de cloroplastos de la célula y estos transgenes son transmitidos de una generación a otra, mientras que en sistemas de expresión transitoria no ocurre la integración y los genes se expresan por un período de tiempo limitado hasta que se pierden.

Para transformar células vegetales, se emplean principalmente dos métodos: biobalístico y transferencia con *Agrobacterium tumefaciens*. En el método biobalístico el plásmido con el gen de interés es depositado sobre micropartículas de metal que son aceleradas para penetrar dentro de la célula con la ayuda de una pistola génica y el DNA liberado se integra en el genoma

blanco, seleccionándose aquellas células en que ha ocurrido integración empleando marcadores de selección. En la metodología que emplea *Agrobacterium sp* se hace uso de la maquinaria de transferencia de genes que poseen estas bacterias que transfieren un fragmento de DNA, denominado T-DNA, que se encuentra en un plásmido (denominado Ti) por un proceso de conjugación siendo uno de los pocos ejemplos de transferencia horizontal entre organismos de distintos reinos (Gelvin 2010, Gelvin 2012). Los sistemas de expresión transitoria más empleados en PMP también hacen uso de la maquinaria de *Agrobacterium sp* pero en este caso la bacteria se infiltra directamente en las hojas donde expresarán las proteínas que luego de unos días son cosechadas. En la actualidad existen un gran número de vectores de expresión en plantas que contienen secuencias derivadas del plásmido Ti (denominados plásmidos binarios) a las que se les adicionó secuencias regulatorias provenientes de virus vegetales que incrementan la transcripción, mejoran la estabilidad del mRNA, facilitan la traducción y en algunos casos copian los mRNA empleando secuencias replicativas y que permiten obtener rendimientos muy altos de la proteína recombinante en muy poco tiempo (Mortimer y col. 2015, Peyret y Lomonossoff 2015).

El éxito de las plantas como biorreactores ha sido demostrado con numerosos productos en el mercado ya sea con aplicaciones terapéuticas, en diagnóstico, en investigación o en cultivos de tejidos (Paul y col. 2015, Lomonossoff y D'Aoust 2016). Entre los productos biofarmacéuticos que se muestran en la Tabla I.1 se encuentran la vacuna de subunidad contra el virus que produce la enfermedad de Newcastle en pollos producida en células de *N. tabacum-1* (NT-1) por Dow AgroScience (Indianapolis, USA) aprobada por el departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) en el año 2006 (Vermij 2006), el primer anticuerpo producido en tabaco que alcanzó una escala comercial (empleado en la producción de la vacuna cubana contra la hepatitis B) (Kaiser 2008), así como también el primer biofarmacéutico  $\beta$ -glucocero-brosidasa/alfa taliglucerasa producido en suspensiones de células de zanahoria aprobado por la FDA para tratamiento humano en el año 2012 comercializado por Protalix BioTherapeutics (Israel) como Elelyso® (Fox 2012). Además la aprobación por la Organización Mundial de la Salud, del uso del cocktail de tres anticuerpos monoclonales ZMapp producido en *N. benthamiana*

para tratar un número reducido de pacientes con fines humanitarios durante al brote de Ébola desatado en África occidental en el 2014 a pesar de que dicho producto no había completado las etapas de evaluación clínica (Streatfield y col. 2015). Asimismo una vacuna contra la gripe pandémica H5N1 producida en tabaco por Medicago (Canadá) que está actualmente en etapas de evaluación clínica III y cuenta con una autorización para ser empleada en caso de una emergencia (<http://www.medicago.com/English/Products/product-pipeline/default.aspx>). También se encuentra en evaluación clínica un anticuerpo anti-HIV para prevenir la transmisión del virus producido en plantas transgénicas de tabaco (Sack y col. 2015). A estos productos se suman otros no-biofarmacéuticos comercialmente disponibles en la actualidad (Tabla I.2) como por ejemplo el colágeno, anticuerpos, factores de crecimiento, citoquinas, avidina, albumina, lactoferrina, insulina, aprotinina y enzimas como tripsina, lisozima,  $\alpha$ -amilasa y enteroquinasa (Lomonossoff y D'Aoust 2016, Tschofen y col. 2016). Esta variedad de productos fue desarrollada por diferentes empresas principalmente para ser utilizados como reactivos tanto de investigación como en procesos industriales (enzimas o reactivos de purificación), aplicaciones en salud e ingredientes cosméticos, entre otros. En el desarrollo de estos productos se han utilizado diferentes especies vegetales según el caso, tales como tabaco, maíz, arroz (granos o suspensión de células) o trigo, ya sea mediante transformación estable o transitoria. Las ventajas que representan para la empresa la selección de estos sistemas de expresión radican principalmente en el bajo costo de producción y en la posibilidad de no utilizar animales en el proceso.

Tabla I.1. Productos biofarmacéuticos producidos en plantas en fase de ensayos clínicos o aprobados

Producto	Aplicación	Desarrollador	Planta	Tecnología de transformación	Estado de desarrollo	Referencia
Vacuna de subunidad	Prevención- Enfermedad de Newcastle	Dow AgroScience	Tabaco (Suspensiones celulares)	Transformación estable	Aprobado en Estados Unidos.	<a href="http://www.dowagro.com">http://www.dowagro.com</a>
Taliglucerasa alfa	Terapia de reemplazo para la Enfermedad de Gaucher	Protalix Biotherapeutics	Zanahoria (Suspensiones celulare)	Transformación estable	Aprobado en Estados Unidos y otros países.	(Fox 2012, Tekoah y col. 2015)
Paclitaxel y docetaxel	Principios activos para tratamientos de cancer de mama, ovarios, etc.	Phyton Biotech	Suspensiones celulares de la familia Euphorbiaceae	Screening de especies con mayores rendimientos de distintos metabolitos secundarios	Aprobados en USA; Japón, china, Corea, Canada, Australia y Rumania	<a href="http://www.phytonbiotech.com/">http://www.phytonbiotech.com/</a>
Particula similar al virus de influenza H5N1	Vacuna contra influenza pandémica	Medicago	<i>N. benthamiana</i>	Expresión transitoria utilizando agroinfiltración con <i>Agrobacterium</i>	Fase 2	(Landry y col. 2010)
Particula similar al virus cuadrivalente de influenza	Vacuna estacional de influenza	Medicago	<i>N. benthamiana</i>	Expresión transitoria utilizando agroinfiltración con <i>Agrobacterium</i>	Fase 2	(ClinicalTrials.gov 2016)
IgG idiotipo derivado de tumor	Vacuna terapéutica para linfoma (excepto linfoma de Hodgkin's)	Icon Genetics	<i>N. benthamiana</i>	Expresión transitoria utilizando agroinfiltración con <i>Agrobacterium</i>	Fase 1	(Tusé y col. 2015)
IgA-IgG híbrido secretorio	Tratamiento para caries dentales	Planet Biotechnology	Tabaco	Transformación estable	Fase 2	(Weintraub y col. 2005)
IgG anti-HIV humano	Prevención de la transmisión de HIV	Consortio Pharma-Planta	Tabaco	Transformación estable	Fase 1	(Ma y col. 2015)
Cocktail de IgG quimérico anti-Ébola	Tratamiento de infección por el virus del Ébola	Mapp Biopharmaceutical	<i>N. benthamiana</i>	Expresión transitoria utilizando agroinfiltración con <i>Agrobacterium</i>	Fase 1/2	(Qiu y col. 2014)
Trastuzumab.	Tratamiento de cáncer de mama	Plant Form	<i>N. benthamiana</i>	Expresión transitoria utilizando agroinfiltración con <i>Agrobacterium</i>	Espera lanzarlo al Mercado en el 2018	<a href="http://www.plantformcorp.com/products.aspx">http://www.plantformcorp.com/products.aspx</a>

Tabla adaptada de Lomonosoff y D'Aoust 2016 (Lomonosoff y D'Aoust 2016)

Tabla I.2. Productos no-biofarmacéuticos producidos en plantas comercialmente disponibles

Producto	Aplicación	Empresa	Planta	Tecnología de transformación	Estado de desarrollo	Ventaja del sistema	Referencia
Colágeno	Reactivo para investigación, cultivo de tejidos, aplicaciones en salud.	Collplant	Tabaco	Transformación estable	Comercializado	Costo reducido, no presenta riesgo de patógenos animales	<a href="http://www.collplant.com">http://www.collplant.com</a>
Factores de crecimiento, citoquinas, tiorredoxina, TIMP-2	Reactivos para investigación	Agrenvec	Tabaco	Transformación transitoria	Comercializado	Costo reducido, no presenta riesgo de patógenos animales	<a href="http://www.agrenvec.com">http://www.agrenvec.com</a>
Tripsina, avidina, endo-1,4-β-D-glucanasa	Reactivos para investigación	ProdiGene/ Sigma-Aldrich	Maíz	Transformación estable	Comercializado	Costo reducido, no presenta riesgo de patógenos animales	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a>
Celobiohidrolasa I	Reactivo para investigación o industria	Infinite Enzymes/ Sigma-Aldrich	Maíz	Transformación estable	Comercializado	Costo reducido, producción integrada	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a>
Albumina, lactoferrina, lisozima, tranferrina, insulina	Reactivos para investigación	Ventria Bioscience/ InVitria	Arroz	Transformación estable	Comercializado	Costo reducido, no presenta riesgo de patógenos animales	<a href="http://www.invitria.com">http://www.invitria.com</a>
Aprotinina	Reactivo para investigación	Kentucky Bio-Processing	Tabaco	Transformación transitoria	Comercializado	Costo reducido	<a href="http://www.kbpllc.com">http://www.kbpllc.com</a>
Factores de crecimiento, Citoquinas	Reactivos para investigación	ORF Genetics	Trigo	Transformación estable	Comercializado	Costo reducido, no presenta riesgo de patógenos animales	<a href="http://www.orfgenetics.com">http://www.orfgenetics.com</a>
Tripsina, enteroquinasa, factores de crecimiento, citoquinas	Reactivos para investigación, ingredientes cosméticos	Natural Bio-Materiales	Suspensión de células de arroz	Transformación estable	Comercializado	Costo reducido, no presenta riesgo de patógenos animales	<a href="http://www.nbms.co.kr">http://www.nbms.co.kr</a>
Anticuerpo contra antígeno de hepatitis B	Reactivo para purificación de la vacuna contra hepatitis B	Center for Genetics Engineering and Biotechnology, Cuba	Tabaco	Transformación estable	Desarrollando aplicación comercial	Costo reducido	<a href="http://gndp.cigb.edu.cu">http://gndp.cigb.edu.cu</a>
α-amilasa	Producción de bioetanol	Syngenta	Maíz	Transformación estable	Comercializado	Costo reducido, Producción integral	<a href="http://www.syngenta.com">http://www.syngenta.com</a>
Factores de crecimiento	Reactivo para el cultivo de tejidos	NexGen	Tabaco	Transformación transitoria	Comercializado	Costo reducido, no presenta riesgo de patógenos animales	<a href="http://www.nexgen.com">http://www.nexgen.com</a>

Tabla adaptada de Tschofen y colaboradores 2016 (Tschofen y col. 2016)

Los ejemplos mencionados muestran el posicionamiento alcanzado por las plantas como plataformas de producción de proteínas que ha ido acompañado por la construcción de diferentes plantas de manufactura a gran escala en todo el mundo; muchas de ellas con capacidad para producir bajo normas GMP (Holtz y col. 2015). A pesar de los grandes avances, todavía queda un largo camino por recorrer ya que los niveles alcanzados son, en muchos casos, inferiores a los obtenidos con otros sistemas de producción. En este sentido, numerosos factores afectan el rendimiento en la producción de una proteína recombinante, tanto en la etapa de su síntesis (*upstream*) como en el proceso de purificación (*downstream*). Algunos de estos factores pueden ser modificados para mejorar el rendimiento del proceso productivo, como se detalla en las secciones siguientes.

## **2. Factores que determinan la eficiencia del proceso de producción (*Upstream*) de una proteína foránea**

Para que la producción de una proteína de interés en plantas resulte económicamente rentable es necesario alcanzar altos rendimientos, lo que dependerá de dos factores principales como son la síntesis y la degradación (Egelkroun y col. 2012). La velocidad de síntesis depende de la velocidad de transcripción, vida media del mRNA y velocidad de traducción. La velocidad de degradación depende de la capacidad de la célula para plegar correctamente la proteína foránea y de su susceptibilidad a la proteólisis.

La velocidad de transcripción depende fundamentalmente del promotor escogido, de la presencia de secuencias facilitadoras (enhancers), de la incorporación de intrones y de silenciamiento génico transcripcional (Egelkroun y col. 2012). La estabilidad del mRNA foráneo dependerá principalmente de las regiones no traducidas 5' y 3' (UTRs) y los fenómenos de silenciamiento génico postranscripcional. La velocidad de traducción depende de las regiones no transcriptas 5' y 3' (UTRs) y del uso de codones (Egelkroun y col. 2012). Con el objetivo de lograr altos niveles de síntesis se han desarrollado diferentes estrategias algunas de las cuales se detallarán a continuación.

Uno de los factores que afectan a la velocidad de síntesis es el promotor seleccionado. Existen numerosas opciones para la expresión en hojas de plantas, pero uno de los más utilizados es promotor viral 35S proveniente del virus de mosaico del coliflor (CaMV) que permite alcanzar altos niveles de expresión. En los últimos años se encontraron otros promotores más adecuados y activos según el sistema de expresión utilizado, algunos ejemplos son el de la plastocianina (Vezina y col. 2009), faseolina para la expresión en semillas (De Jaeger y col. 2002), el de glutelinas (De Muynck y col. 2010), el de alfa prima beta conglucina (Petrucci y col. 2006), incluso han surgido versiones sintéticas (Koul y col. 2012) y promotores inducibles (Dugdale y col. 2013).

En cuanto a los métodos de optimización de codones, consideran que los codones raros son limitantes de la velocidad para la síntesis de proteínas y que los codones sinónimos son intercambiables y varían en la extensión de otras características consideradas tales como presencia de secuencias en el mRNA que pueden inhibir la expresión, por ejemplo, elementos de inestabilidad de mRNA, el contexto de nucleótidos del codón de iniciación, estructuras secundarias de mRNA, repeticiones de secuencia, composición de nucleótidos, sitios de entrada de ribosomas internos, sitios putativos de *splicing*. Además, algunos programas consideran información estructural de la proteína, sitios poli (A) intragénicos, codones de stop en los marcos de lectura alternativos y dinucleótidos que son blanco para la escisión de las RNAsas, la mutación y el silenciamiento génico dependiente de la metilación (Chin y col. 2014, Mauro y Chappell 2014). Algunos algoritmos utilizan el codón más frecuente para todas las instancias de un aminoácido mientras que otros ajustan el uso del codón para que sea proporcional a la distribución natural del organismo huésped de forma de identificar y mantener las regiones de traducción lenta consideradas importante para el plegamiento de proteínas. Otros métodos tienen en cuenta a los tRNAs más abundantes utilizando codones de acuerdo a esta abundancia, sustituyendo selectivamente codones raros o evitando ocurrencias de codones pares que se sabe que se traducen lentamente (Mauro y Chappell 2014). En la bibliografía se informan casos en los que no se detectaron diferencias significativas, incluso casos en que el gen nativo produce mayores niveles que la versión del gen de interés con codones optimizados, mientras que en otros

casos los niveles de acumulación se ven incrementados en más de 1000 veces (Egelkroust y col. 2012, Gustafsson y col. 2012). Es por ello que la selección de parámetros de diseño más eficaz se encuentra actualmente en discusión.

Una de las estrategias para incrementar los rendimientos que se ha vuelto muy popular cuando se emplean métodos de expresión transitoria lo constituyen el uso de supresores virales de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) (Baulcombe y col. 2000, Voinnet y col. 2003). Algunos de los PTGS derivados de virus más utilizados son RYMV-p1 (*Rice Yellow Mottle Virus*), GVA-p10 (*Grapevine Virus A*), TBSV-p19 (*Tomato Bushy Stunt Virus*), BYV- p21 (*Beet Yellow Virus*), GLRaV p24 (*Grapevine Leaf Roll Associated Virus*), p25 (*Potato Virus X*), TCV- p38 (*Turnip Crinkle Virus*), CMV-2b (*Cucumber Mosaic Virus*), PVY-HCPro (*Potato virus Y*) y TEV-HCPro (*Tobacco Etch Virus*) siendo su efecto dependiente de la proteína de interés, las condiciones de agroinfiltración empleadas y el número de días postinfiltración a los que se evalúa el efecto (Lombardi y col. 2009, Circelli y col. 2010, De Muynck y col. 2010, Arzola y col. 2011).

Entre los factores postraduccionales, la localización subcelular es de particular interés ya que tiene un profundo impacto en los rendimientos de proteínas (Egelkroust y col. 2012, Nausch y col. 2012, Marin Viegas y col. 2016). Estas estrategias de direccionamiento, como la retención en retículo endoplásmico (Wandelt y col. 1992, Conrad y Fiedler 1998, Petruccelli y col. 2006) y direccionamiento vacuolar (Yang y col. 2005, Shaaltiel 2006, Shaaltiel y col. 2007, Cheung y col. 2009, Jackson y col. 2010, Jha y col. 2012, De Marchis y col. 2013) (sin considerar la transformación de cloroplastos ya que el procesamiento postraduccionales de la proteína es limitado) se desarrollaron principalmente para evitar la degradación que ocurre en el apoplasto (Stoger y col. 2005, Petruccelli y col. 2006, Benchabane y col. 2008, Goulet y col. 2012, Hehle y col. 2015). Hasta el momento la más eficiente sigue siendo la retención en el retículo endoplásmico aunque resulta interesante evaluar otros compartimentos ya que su efecto es dependiente de la proteína (Conrad y Fiedler 1998, Schillberg y col. 2002, Petruccelli y col. 2006).

También el estado fisiológico de la planta, incluyendo su etapa de desarrollo y su interacción con el entorno, es un factor que puede afectar los

niveles de expresión obtenidos, remarcando la importancia de las condiciones de cultivo (Buyel & Fischer 2012; Stevens et al. 2000; Twyman et al. 2013).

En los últimos años también han cobrado mucha importancia los vectores híbridos o desarmados que toman las ventajas del *Agrobacterium* para transferir el DNA a la célula vegetal y de los virus de amplificarlo (Gleba y col. 2014, Peyret y Lomonossoff 2015). Además se han desarrollado nuevos vectores binarios como por ejemplo el pEAQ que permite introducir el gen de interés entre los 5' y 3' UTR (*untranslated regions*) del RNA2 de CPMV (Cowpea mosaic virus) y que contiene el gen codificante para el inhibidor de silenciamiento génico postranscripcional P19 TBSV (*Tomato bushy stunt virus*) dentro del T-DNA. El pEAQ permite obtener rendimientos tan altos como los obtenidos con los sistemas que usan vectores híbridos (Sainsbury y col. 2009). También se han generado vectores binarios de menor tamaño y que facilitan el clonado de los genes de interés empleando diferentes recombinasas (Karimi y col. 2007, Nakagawa y col. 2009) o endonucleasas de tipo IIS que generan extremos cohesivos Golden Braid (Sarrion-Perdigones y col. 2011, Patron y col. 2015).

En la literatura existe una amplia variación en la cantidad de agrobacterias utilizada para sobreexpresar la proteína de interés y en la mayoría de los casos no se indica si dichas condiciones fueron optimizadas. Por ejemplo Garabagi y col. 2012 en el manual "Antibody Engineering: Methods and Protocols" (Garabagi y col. 2012) recomiendan una  $DO_{600}$  de 0.2 para cada uno de los *agrobacterium* que llevan los genes para las cadenas livianas y pesadas de un anticuerpo si los mismos se encuentran en vectores binarios convencionales y una  $DO_{600}$  de 0.002 si se encuentran en vectores binarios híbridos con replicones virales (Garabagi y col. 2012). Para el caso del vector pEAQ se muestra que variando la  $DO_{600}$  entre 0,1-1.2 se producen cambios en cantidad de proteína recuperada lo que indica que es una variable importante a ajustar (Sainsbury y col. 2009). El vector pEAQ ha sido utilizado en numerosos trabajos que tienen como objetivos sobreproducir una proteína de interés y en particular si miramos los que utilizan hojas de *N.benthamiana* y diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens* las  $DO_{600}$  empleadas para infiltrar fueron variables entre 0,002 y 0,8 como se puede apreciar en la Tabla I.3.

Otros ejemplos que emplean vectores binarios convencionales expresando también en *N. benthamiana* empleando las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* más comunes se muestran también en la Tabla I.3, donde vemos que el rango de  $DO_{600}$  utilizado varía entre 0,2 y 1. Para casos en los que se comparan diferentes vectores como pZP3425, pPZP5025, pJLTRBO y pBY030 se utilizan  $DO_{600}$  de 1 (Shah y col. 2013). Otro aspecto interesante surge de los trabajos de glicoingeniería realizados en el laboratorio de la Dra. Steinkellner en los que se expresan temporalmente 6 genes clonados separadamente en pBin19 para transferir la vía de sialilación a plantas y emplean una  $DO_{600}$  de 0.1 (rango 0.02–0.3) para cada una de estas cepas de agrobacterias y un anticuerpo reportero en pTra  $DO_{600}$  de 0.05 (rango 0.004–0.3) logrando una sialilación uniforme del anticuerpo usado como molécula reportera (Castilho y col. 2010, Castilho y Steinkellner 2016). Este resultado indica que los ocho genes localizados en siete T-DNA diferentes son transferidos a la mayoría de las células y logran expresarse aunque la cantidad de agrobacterias empleadas son más de un orden de magnitud inferiores a las utilizadas para sobreexpresar otras proteínas de interés. Como se puede apreciar en la Tabla I.3, los niveles de expresión obtenidos para las diferentes proteínas de interés son muy variados en la bibliografía, aunque para algunos casos la utilización del vector pEAQ-HT ha sido capaz de alcanzar niveles de expresión comparables con los de los replicones virales. Sin embargo, incluso para estos casos es necesario ajustar las condiciones de expresión ya que los niveles obtenidos pueden variar según numerosos factores tales como la  $DO_{600}$  de agrobacterias utilizada y su estado fisiológico, el vector de expresión seleccionado y sus características, el efecto de PTGS como p19, el tiempo postinfiltración en que se cosecha la muestra, incluso las condiciones de cultivo (intensidad de luz recibida, fluctuaciones de temperatura, humedad), entre otros. La suma de estos ejemplos muestra que aún para casos donde se utiliza el mismo vector, pueden emplearse condiciones de transformación muy diferentes, y que no se encuentra una relación aplicable a todos los casos entre la  $DO_{600}$  utilizada, el tiempo postinfiltración para cosechar y los niveles de acumulación de la proteína de interés obtenidos.

Tabla I.3. Condiciones utilizadas para expresión temporal de proteínas recombinantes

Proteína	Plásmido	Cepa agrobacterium	planta	DO <sub>600</sub>	dpi	Nivel	Observación	Referencia
Anticuerpo	Binario convencional	No informado	<i>N. benthamiana</i>	0,2	3-8	No informado	Indica condiciones generales de expresión de anticuerpos.	(Garabagi y col. 2012)
Anticuerpo	Vector binario basado en virus	No informado	<i>N. benthamiana</i>	0,002	3-8	No informado	Indica condiciones generales de expresión de anticuerpos.	(Garabagi y col. 2012)
Fgl-4M	pA7248AMV	GV3101	<i>N. benthamiana</i>	0,2	4	1mg/g hoja fresca	Sin optimización de codones.	(Mardanova y col. 2015)
	pEAQ-HT	GV3101	<i>N. benthamiana</i>	0,2	4	~0,6mg/g hoja fresca	Sin optimización de codones.	(Mardanova y col. 2015)
Genérico	pEAQ-HT	LBA4404	<i>N. benthamiana</i>	0,4	3-10 dependiendo de la proteína	No reportado	Coexpresión de múltiples enzimas de una vía metabólica.	(Saxena y col. 2016)
IgG	pEAQ-HT	AGL1	<i>N. benthamiana</i>	0,4	6	No reportado	Cadenas por separado en diferentes bacterias. Sin optimización de codones.	(Robert y col. 2016)
IgG	pBI	AGL1	<i>N. benthamiana</i>	0,5	6	43.6 ± 5.8 mg/kg	La coexpresión con un inhibidor de proteasas en pEAQ permite una recuperación más eficiente y no se percibe degradación. Sin optimización de codones.	(Jutras y col. 2016)
L1 de papilomavirus bovino	pEAQ-HT	LBA4404	<i>N. benthamiana</i>	0,5	5	224 mg/kg de hoja fresca	Se realizó optimización de codones.	(Love y col. 2012)
Hemaglutinina	pEAQ-HT	LBA4404	<i>N. benthamiana</i>	0,6-0,7	6	0,2 g/kg de hoja	Se realizó optimización de codones.	(Kanagarajan y col. 2012)
L1	pEAQ-HT	LBA4404	<i>N. benthamiana</i>	0,8	6	60 mg/kg	En el vector replicativo TMV se expresó 17 veces menos	(Matic y col. 2012)
L1ΔC22	pEAQ-HT	LBA4404	<i>N. benthamiana</i>	0,8	6	240 mg/kg	Versión de L1 con la señal de localización nuclear C-terminal deletada.	(Matic y col. 2012)
Cadena pesada de un anticuerpo	pBIN	LBA4404	<i>N. benthamiana</i>	0,5	6	37,9 mg/kg	Utilizan TBSV-p19. Direccionada a RE	(Sainsbury y col. 2010)
Cadena pesada de un anticuerpo	pBD	LBA4404	<i>N. benthamiana</i>	0,5	6	123,9 mg/kg	Con UTRs de CPMV Direccionada a RE.	(Sainsbury y col. 2010)
IgG	pBI121	LBA4404	<i>N. benthamiana</i>	0,6	6	640 ± 20 mg/kg	Utilizan TBSV-p19. Infiltración por vacío	(Lombardi y col. 2010)

IgG	pGA482 y pGWB2	GV3101	<i>N. benthamiana</i>	0,6	5 a 8	1.57%–1.73% TSP para versiones de retículo y vacuola, 0.13%TSP para la versión secretoria	Utilizan TBSV-p19	(Ocampo y col. 2016)
EPO	pCaMterX	EHA105	<i>N. tabacum</i>	1	4	88 ng/mg TSP	La versión nativa tuvo mayor nivel de acumulación que las versiones con codones optimizados.	(Conley y col. 2009)

Nota: Los autores Love, Kanagarajan y Conley realizaron optimización de codones para las secuencias codificantes de las proteínas producidas. Todos tuvieron en cuenta el uso de codones mayoritarios y contenido de GC similar al sistema de expresión. Además, evitaron señales de procesamiento potencialmente perjudiciales como sitios de *splicing* crípticos. Se tuvo en cuenta también la estructura secundaria y la estabilidad del ARNm. Se diferenciaron en que Love eliminó además los sitios prematuros de PoliA y regiones propensas al silenciamiento génico mientras que Kanagarajan descartó secuencias correspondientes a TATA-boxes internos, *chi-sites*, sitios de entrada ribosomales, regiones con alto contenido de GC o AT, *hairpin-loops* largos y secuencias repetitivas.

A pesar de los grandes avances que han permitido mejorar la síntesis de muchas proteínas, los rendimientos obtenidos son muy variables como así también las condiciones experimentales utilizadas por lo éstas deben ser evaluadas para cada molécula de interés.

### 3. Tecnologías que apuntan a mejorar el proceso *Downstream*

Tradicionalmente los costos para obtener una proteína recombinante se distribuyen 50 y 50 entre el proceso de síntesis (*upstream*) y de purificación (*downstream*). La producción en plantas reduce notoriamente el costo del proceso *upstream*, pero también es clave a mejorar el *downstream* para que las plataformas PMP sean más competitivas (Lojewska y col. 2016). Por este motivo, en los últimos años se han desarrollado tecnologías que permiten disminuir los costos del proceso *downstream* como por ejemplo en el uso de fusiones a hidrofobinas (Joensuu y col. 2010), oleosinas (Moloney 2002), ZERA (Torrent y col. 2009) y polímeros similares a elastina (ELP) (Floss y col. 2010).

Las hidrofobinas son proteínas de hongos filamentosos ricas en cisteínas y en aminoácidos hidrofóbicos, y son de tamaño pequeño (100 a 10 kDa). Tienen la propiedad de autoensamblarse en interfaces anfipáticas (hidrofílicas/hidrofóbicas) lo que permite la separación eficiente de la proteína fusionada a éste *tag* empleando un sistema de dos fases acuosas (ATPS) (Joensuu y col. 2010). Las fusiones a hidrofobinas no sólo facilitan la recuperación de proteínas sino que aumenta el rendimiento como se observó al fusionarla a la hemaglutinina H1N1 (Jacquet y col. 2014). Además, es posible remover el *tag* introduciendo un sitio de reconocimiento para una proteasa entre la proteína de interés y la hidrofobina (Joensuu y col. 2010).

Las oleosinas son pequeñas proteínas básicas que estabilizan los cuerpos lipídicos que existen en la semilla (Hsieh y Huang 2004). Cuando la proteína de interés se fusiona a estas secuencias, su solubilidad se modifica y se promueve la formación de AOB (artificial oil bodies), por lo cual se concentran en la fase lipídica, siendo estas dos fases fácilmente separadas por centrifugación (Moloney 2002, Chiang y col. 2007, Boothe y col. 2010). Como

alternativa a la fusión directa, para lograr la purificación por este sistema también se puede fusionar a la proteína de interés un ligando con afinidad por la oleosina, fusionar a la oleosina un ligando con afinidad a la proteína de interés, o bien diseñar una molécula constituida por un ligando con afinidad por la oleosina y otro con afinidad por la proteína de interés que permita la interacción (Markley y col. 2006, McLean y col. 2012). El sistema de oleosinas desarrollado por SemBioSys Genetics (Calgary, Canadá) ha sido escalado y actualmente una insulina producida en semillas de cártamo (*Carthamus tinctorius L.*) con esta tecnología se encuentra en etapas de evaluación clínica (Paul y col. 2015).

Otra alternativa es ZERA, un *tag* derivado del dominio N-terminal de las gamas zeínas de maíz rico en prolinas formado por ocho repeticiones de PPPVH. Cuando la proteína heteróloga se fusiona a este *tag*, se deposita en estructuras similares a cuerpos proteicos (PB) dentro del retículo endoplásmico (ER) y pueden separarse por diferencia de densidad (Torrent y col. 2009). Los cuerpos proteicos inducidos en el ER por estas fusiones son capaces de incorporar una gran variedad de proteínas solubles del ER en su interior. Aproximadamente un tercio de las proteínas copurificadas con los PB están relacionadas con el plegado, estrés, procesos de señalización y componentes de la pared celular (Joseph y col. 2012). ZERA ha sido utilizado para producir y purificar proteínas de relevancia industrial como xilanasas (Llop-Tous y col. 2011), alfa amilasa, lipasa y proteína E7 del virus del papiloma humano (HPV) (Whitehead y col. 2014), hemaglutinina H5N1 (Hofbauer y col. 2016) incrementando los rendimientos y la estabilidad de estas proteínas. En el caso de fusiones a antígenos (Ag)-ZERA se observa un incremento del tiempo de vida media en sangre, lo que acrecienta la eficiencia a bajas dosis pudiendo mejorar la respuesta inmune (Hofbauer y col. 2016), (<http://www.zipsolutions.es/>).

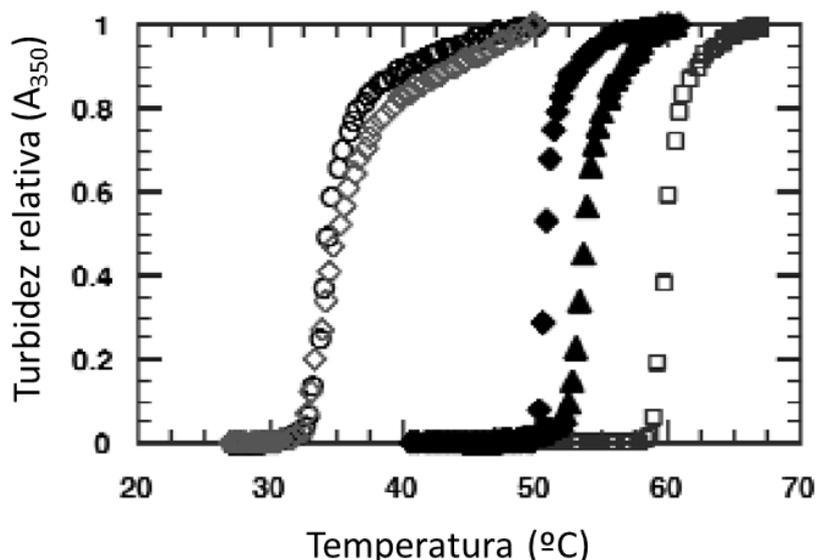
Los polímeros similares a elastina (ELP) son derivados de la tropoelastina humana y están formados por repeticiones del pentapéptido (VPGXG)<sub>n</sub>, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina y n es el número de unidades repetitivas. Los ELP se caracterizan por ser solubles a bajas temperaturas y formar agregados insolubles a temperaturas superiores a una temperatura denominada de transición (T<sub>t</sub>) (Urry y col. 1998). Esta T<sub>t</sub> depende

del aminoácido X, de  $n$  y de la concentración de polímero (Urry y col. 1992). Para los casos de fusiones de proteínas recombinantes a ELP, la  $T_t$  se ve modificada por las características fisicoquímicas de la misma, pudiendo afectar también la pendiente de la curva de turbidimetría vs. temperatura como se muestra en la Figura I.1. La técnica de purificación desarrollada a partir de las características de

ELP se denomina ITC por *inverse transition cycling* (ciclos de transición inversa) y consiste en ciclos de centrifugaciones intercalando

temperaturas por encima y debajo de  $T_t$  (Floss y col. 2008).

Para purificar proteínas por este sistema se puede fusionar directamente la proteína de interés a ELP o bien

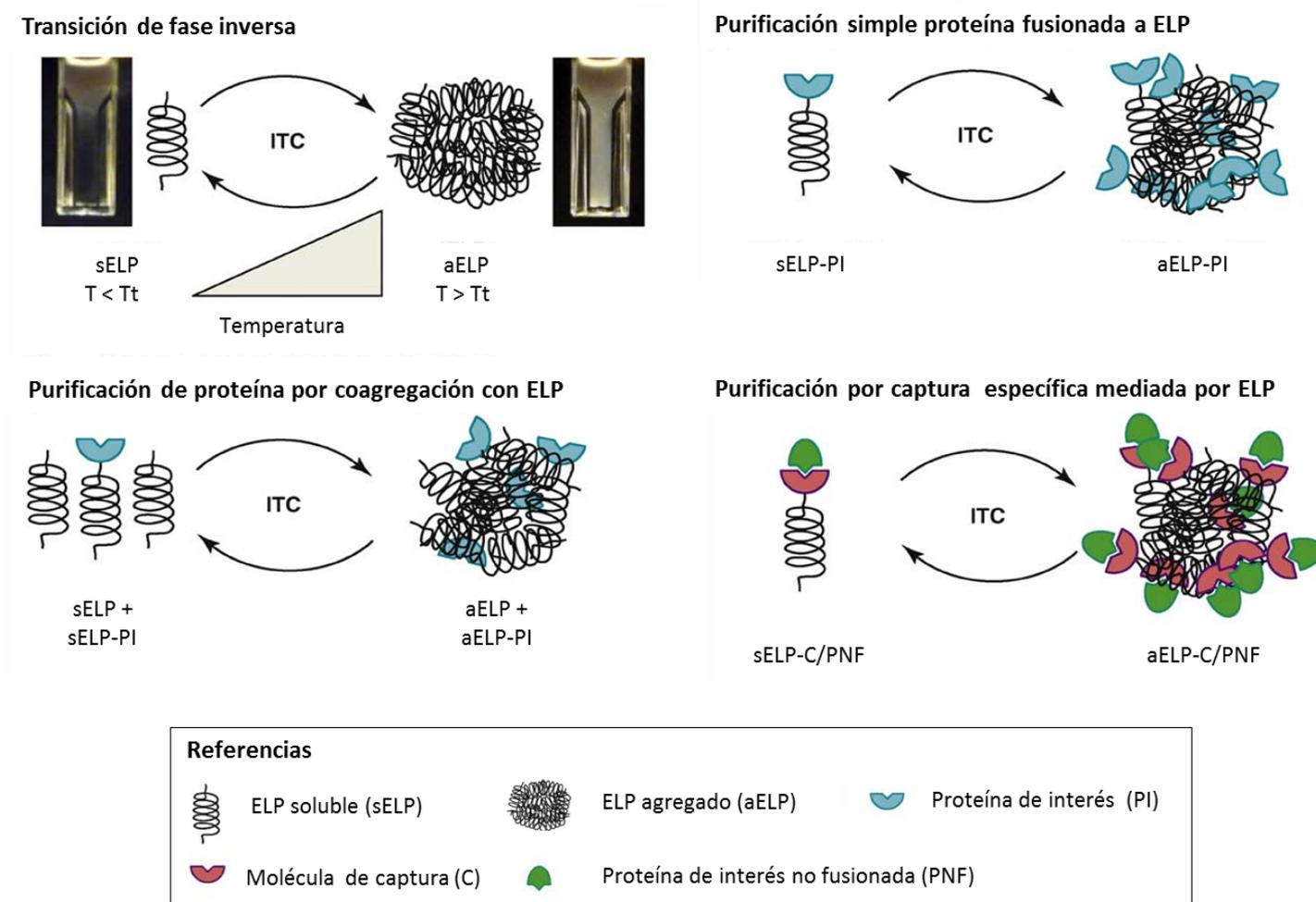


**Figura I.1. Efecto de las fusiones a ELP sobre su  $T_t$ .**

Se muestran los perfiles de turbidimetría para ELP libre (◆); tiorredoxina-ELP (▲); tiorredoxina-ELP-tendamistat (○); ELP-tendamistat (clivado y purificado de tendamistat de tiorredoxina-ELP-tendamistat) (◇); y tiorredoxina-ELP (clivado y purificado de tendamistat de tiorredoxina-ELP-tendamistat) (□). Todas las fusiones contienen el mismo ELP(V5A2G3) de 90 repeticiones. La Temperatura de transición ( $T_t$ ) se calcula como el máximo de la primera derivada de la curva. A esta temperatura aproximadamente la mitad de las moléculas se encuentran agregadas. Figura adaptada de Meyer y Chilkoti, 1999 (Meyer y Chilkoti 1999).

diseñar un sistema de captura fusionando una molécula que capture a nuestra proteína de interés (Floss y col. 2009) (Figura I.2). Otra ventaja que presenta el uso de ELP como *tag* de fusión es que esta molécula es capaz de inducir la formación de PBs en el retículo endoplásmico, lo cual incrementa los niveles de acumulación de las proteínas recombinantes (Conley y col. 2009, Phan y Conrad 2011). Este método de purificación es de bajo costo y simple de escalar, lo que permite su utilización a nivel industrial (Tian y Sun 2011). Otra ventaja que tienen los ELP como *tag* es que no hace falta eliminarlos ya que al ser derivados de la elastina humana son biocompatibles (Chilkoti y col. 2006). La fusión a ELP se ha empleado en varias proteínas de interés biofarmacéutico

producidas en hojas tales como un anticuerpo monoclonal contra el HIV (Floss y col. 2008), interleukinas (IL) 4, IL10, eritropoyetina (Floss y col. 2010), la hemaglutinina H1N1 (Phan y col. 2014), un anticuerpo simple dominio (VHH) cadena contra el TNF (Tumour necrosis factor) (Conrad y col. 2011). Es de destacar que la hemaglutinina H1N1-ELP produce mayores rendimientos que la fusión a hidrofobinas (Phan y col. 2014) y que TNF-VHH-ELP tiene una vida media en sangre 24 veces más alta que una versión TNF-VHH sin fusionar a ELP (Conrad y col. 2011).



**Figura I.2. Sistemas de purificación de ELP y proteínas recombinantes por ITC.**

Se muestra en el panel superior izquierdo una transición de fase inversa reversible para ELP. En el panel superior derecho se encuentra representada la ITC de una proteína de interés ELPilada (ELP-PI), mientras que en el inferior izquierdo se muestra la purificación de la misma fusión ante el agregado de ELP sin fusionar. El panel inferior derecho muestra la purificación de una proteína de interés no fusionada a ELP (PNF) mediante el uso de una molécula de captura fusionada a ELP (ELP-C). Las referencias se muestran en el recuadro. Figura adaptada de Floss y colaboradores 2009 (Floss y col. 2009).

Estos antecedentes muestran que el uso de fusiones a hidrofobinas, oleosinas, ZERA y ELP permiten llevar a cabo un proceso de purificación más simple y de menor costo que las cromatografías actualmente utilizadas. Sin embargo, para la industria biofarmacéutica estas tecnologías no son aplicables a todos los productos, ya que la fusión de estos *tag* a las moléculas de interés pueden presentar desventajas debido a problemas de propiedad intelectual (Conley et al. 2011) y cuestiones regulatorias basadas en la potencial inmunogenicidad del *tag* (Fischer et al. 2012), incluso para el caso de ELP que ha sido descrito como biocompatible (Chilkoti y col. 2006). El uso de proteínas ELPiladas como método de suministro e incremento de la estabilidad de proteínas biofarmacéuticas está en pleno desarrollo con varios productos en etapas avanzadas de evaluación clínica (<http://phasebio.com/pipeline/>), con el objetivo de reemplazar la tecnología de PEGilación que tiene varios inconvenientes.

La simplicidad, buen desempeño y ventajas adicionales de las tecnologías desarrolladas para mejorar el proceso downstream para las plataformas PMP invitan a utilizarlas de forma de desarrollar una estrategia integrada para producir proteínas de interés.

#### **4. La transglutaminasa tisular humana como proteína modelo**

La transglutaminasa tisular humana (TG2) es una enzima de estructura compleja cuya producción resulta de interés para diferentes áreas. Las transglutaminasas tienen la capacidad de catalizar modificaciones post-traduccionales en proteínas y péptidos por lo cual resultan de interés para la industria, ya que se utilizan como biocatalizadores en alimentos, cosmética e industria textil (Kuraishi y col. 1997, Griffin y col. 2002, Özrenk 2006, Arrizubieta 2007). En animales, se encuentra ampliamente distribuida en el citosol de tejidos de varios órganos (Fesus y Piacentini 2002) y ha sido relacionada con patologías como la aterosclerosis, la inflamación, la fibrosis, diabetes Tipo I, las metástasis del cáncer y algunas enfermedades autoinmunes (Griffin y col. 2002, Lorand y Graham 2003). Entre las autoinmunes, se identificó a TG2

como el principal autoantígeno en la enfermedad celíaca (EC) (Dieterich y col. 1997), como se desarrollará en la siguiente sección.

#### **4.1 TG2 como indicador diagnóstico de enfermedad celíaca**

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía crónica mediada por mecanismos inmunológicos, que se desencadena en individuos genéticamente susceptibles por la ingestión de un grupo de prolaminas presentes en trigo, cebada, centeno y avena. Se trata de una de las enfermedades de base genética de mayor prevalencia. Estudios realizados en Europa, Sudamérica, Australia, Asia y Estados Unidos mostraron que entre el 0,5 y el 1% de la población tiene EC no diagnosticada (Van Heel y West 2006). En un estudio realizado en la ciudad de La Plata se determinó que la EC en nuestro país tiene una prevalencia similar a la observada en Europa, Australia, Asia y Estados Unidos y que la misma se encuentra subdiagnosticada (Gomez y col. 2001). Se estima que sólo un 10% de las personas afectadas por EC son diagnosticadas (Rewers 2005, Gasbarrini y col. 2008) y en general se debe principalmente al hecho de que los pacientes frecuentemente no presentan la sintomatología típica de la enfermedad.

El diagnóstico como prueba de certeza continúa siendo mediante la biopsia de intestino delgado, pero debido a que este método es muy invasivo, costoso y no adecuado para *screening*, se han desarrollado distintos ensayos serológicos que a lo largo del tiempo han mejorado en cuanto a la sensibilidad y especificidad (Dewar y Ciclitira 2005, Hill 2005). Los ensayos serológicos permiten realizar un examen sencillo, no invasivo y económico para seleccionar individuos con la posibilidad de padecer EC que luego será confirmada por biopsia de intestino delgado (Gomez y col. 2002). El empleo de los ensayos serológicos mejora el diagnóstico de EC en la población y disminuye también el número de biopsias de intestino realizadas a pacientes sanos. Teniendo en cuenta que un gran porcentaje de los pacientes es diagnosticado en una edad comprendida entre los 9 y 24 meses de edad, la reducción del número de biopsias innecesarias es un aspecto importante a resolver. Recientemente, la Sociedad Europea de Gastroenterología Hepatología y Nutrición Pediátrica

(ESPGHAN) propuso nuevos protocolos para el diagnóstico de niños. Sugieren que en pacientes pediátricos con sintomatología clara y cuyos exámenes serológicos positivos cumplan determinadas condiciones, no es necesario confirmar la EC por biopsia de intestino (Husby y col. 2012). Este protocolo también se ha propuesto para pacientes adultos (Caicedo y Hill 2008), ubicando al diagnóstico por serología en un lugar prioritario para estos casos.

El desarrollo de ensayos serológicos para EC comenzó en la década de los `80 cuando se evaluaban por ELISA los anticuerpos anti-gliadinas y luego la presencia de anticuerpos anti-endomiso (Van Heel y West 2006). A partir de la identificación de transglutaminasa tisular (TG2) como el principal antígeno reconocido por los anticuerpos anti-endomiso en 1997 (Dieterich y col. 1997) se desarrollaron nuevos ensayos de ELISA para detectar la presencia de anticuerpos anti-TG2 de los isotipos IgA e IgG, utilizando TG2 de hígado de cobayo como antígeno (Gomez y col. 2002). Posteriormente se desarrollaron ensayos de segunda generación empleando TG2 humana recombinante o purificada, que resultaron más sensibles y eficientes que los anteriores aunque también más costosos (Blackwell y col. 2002, Osman y col. 2002, Fabiani y col. 2004, Fernández y col. 2005, Prince 2006, Zintzaras y Germenis 2006, Ocmant y Mascart 2007, Stenberg y col. 2008). Entre los diferentes ensayos comerciales disponibles para detectar EC, el que presenta mayor sensibilidad hasta el momento evalúa la presencia en suero humano de inmunoglobulina A (IgA), específica de TG2 (Aeskulisa Celi Check). Otro método de alta sensibilidad fue desarrollado en Cuba, HEBER FAST LINE anti-transglutaminasa que consiste en una inmunocromatografía que utiliza TG2 purificada de sangre conjugada a oro coloidal inmovilizada, da mejores resultados que los ELISA IgA-TG2 (Sorell Gómez y Acevedo Castro 2005, Galván Cabrera 2010). Estos datos muestran concretamente que TG2 es un buen candidato para desarrollar métodos de diagnóstico masivos de EC, sin embargo es fundamental contar con TG2 purificada o recombinante de bajo costo.

## 4.2 Síntesis de TG2

La producción de TG2 ha sido abordada desde diferentes sistemas de expresión como *Escherichia coli* (Shi y col. 2002) y células de insecto (Osman y col. 2002). Sin embargo TG2 ha mostrado efectos tóxicos en estos sistemas (Sorrentino y col. 2005), efecto atribuido a su actividad enzimática de entrecruzar proteínas. La toxicidad TG2 determina que se acumule en niveles muy bajos en los distintos sistemas, lo que dificulta su purificación (Sorrentino y col. 2005, Sorrentino y col. 2009, Sorrentino y col. 2009). Las plantas representan un sistema eucariota altamente capaz de producir moléculas complejas con un costo de producción muy inferior al de células de insecto, por lo cual unos años más tarde se estudió también su expresión en este sistema.

TG2 ha sido producida de manera estable en suspensiones de células de mesófilo de tabaco indiferenciadas BY2 (Bright Yellow 2) empleando variantes de un vector binario con señales para evitar la formación de heterocromatina y para expresar en el citoplasma, dirigir al apoplasto o a cloroplastos (Sorrentino y col. 2005). Los mayores rendimientos se obtuvieron para la forma dirigida a cloroplastos, mientras que la expresión en citoplasma impidió la regeneración de los tejidos (Sorrentino y col. 2005). Estas construcciones también fueron utilizadas para obtener plantas transgénicas de tabaco, obteniéndose niveles de acumulación 18-75 µg/g (Sorrentino y col. 2009). La TG2 producida con estos vectores, mantuvo su actividad catalítica intacta y fue reconocida por anticuerpos humanos anti-TG2, mostrando un comportamiento similar a la producida en bacterias. A pesar de que la TG2 producida por plantas fue reconocida por la IgA sérica de los pacientes celíacos (Sorrentino y col. 2005) no se han informado más esfuerzos para producir TG2 en las plantas.

## 4.3. El diagnóstico de enfermedad celíaca en Argentina

A pesar de que se ha implementado el Programa Nacional de Detección y Control de la EC impulsado por el Ministerio de Salud de la Nación y aprobado por la Resolución 1560/2007 ([www.msal.gov.ar/celiacos/pdf/resolucion-programa.pdf](http://www.msal.gov.ar/celiacos/pdf/resolucion-programa.pdf)) y de que diferentes

organizaciones sin fines de lucro tales como el grupo promotor de la ley celíaca (<http://www.ley-celiaca.com.ar/>) y la Asociación Celíaca Argentina (<http://www.celiaco.org.ar/>) trabajan para mejorar la calidad de vida de los pacientes y solicitan la implementación de políticas públicas que resuelvan el problema del subdiagnóstico, sólo un 10% de las personas afectadas por EC en Argentina han sido diagnosticadas. Uno de los problemas es que el costo de los kits diagnósticos en el país es muy alto (127 pesos argentinos cada uno) por lo que no se hacen ensayos masivos de detección. Por este motivo, en este trabajo se volcaron los esfuerzos en desarrollar un método económico de producción de TG2.

*Objetivos*

La hipótesis general de este trabajo es que la TG2 humana se podría producir eficientemente empleando un sistema de expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*, superando las limitaciones que tienen otros sistemas de expresión, y que la TG2 obtenida sería de utilidad en el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

En este sentido, se planteó como objetivo general desarrollar una plataforma basada en expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*, evaluando distintas alternativas para mejorar tanto las etapas del proceso síntesis como así también de purificación de TG2. Con relación a este último punto se ideó un sistema novedoso de purificación por precipitación selectiva de TG2 con una molécula de inmunocaptura formada por un anticuerpo simple cadena (scFv) específico de TG2 y un nuevo polímero similar a elastina (ELP). Para alcanzar este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

**-Objetivos que apuntan al incremento de la síntesis por expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana***

- Determinar el compartimiento celular donde TG2 se obtiene con mayores rendimientos.
- Diseñar una molécula formada por fusión de scFv y ELP para purificar TG2 por inmunocaptura.
- Producir la molécula de inmunoprecipitación scFv-ELP por expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*.
- Estudiar el impacto de la coexpresión de la molécula de inmunocaptura en los rendimientos de TG2.

**-Objetivos enfocados a la mejora del proceso de purificación de las proteína producidas**

- Evaluar si las moléculas fusionadas a ELP pueden ser purificadas por precipitación selectiva y determinar las mejores condiciones para los ciclos de transición inversa.
- Estudiar la capacidad de la molécula de captura para reconocer y precipitar específicamente TG2.

**-Objetivo vinculado a las características de TG2 como antígeno**

- Analizar la utilidad de TG2 producido en plantas como antígeno para el diagnóstico de la enfermedad celíaca (EC).

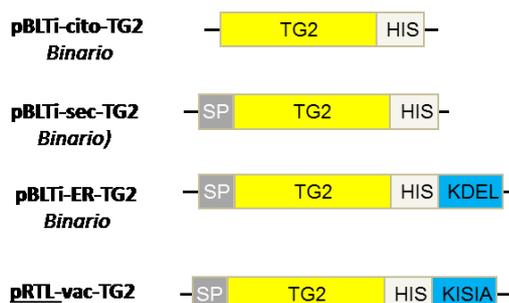
*Resultados*

## 1. Impacto de la localización subcelular de transglutaminasa tisular humana (TG2) en los rendimientos obtenidos por expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*

### 1.1 Fusión de TG2 a diferentes señales de direccionamiento subcelular y subclonado en un vector binario

Teniendo en cuenta que los rendimientos de una proteína foránea son fuertemente dependientes del compartimiento subcelular al que se la dirige (Egelkroust y col. 2012), se decidió estudiar el efecto del direccionamiento en la acumulación de TG2. En células humanas, TG2 se encuentra en el citosol por lo que además de generar una versión citosólica (cyto-TG2) se planteó introducirla en la vía secretoria y analizar la acumulación en el apoplasto (sec-TG2), retículo endoplásmico (ER-TG2) y en vacuolas (vac-TG2). Las diferentes construcciones fueron generadas por el grupo de investigación, previo a este trabajo de tesis, empleando como material de partida una serie de vectores que contenían GFP o GFP-GUS dirigidas a distintos compartimientos subcelulares (Petruccelli y col.

#### Construcciones disponibles



#### Construcciones obtenidas



**Figura 1. Esquema de construcciones de TG2**

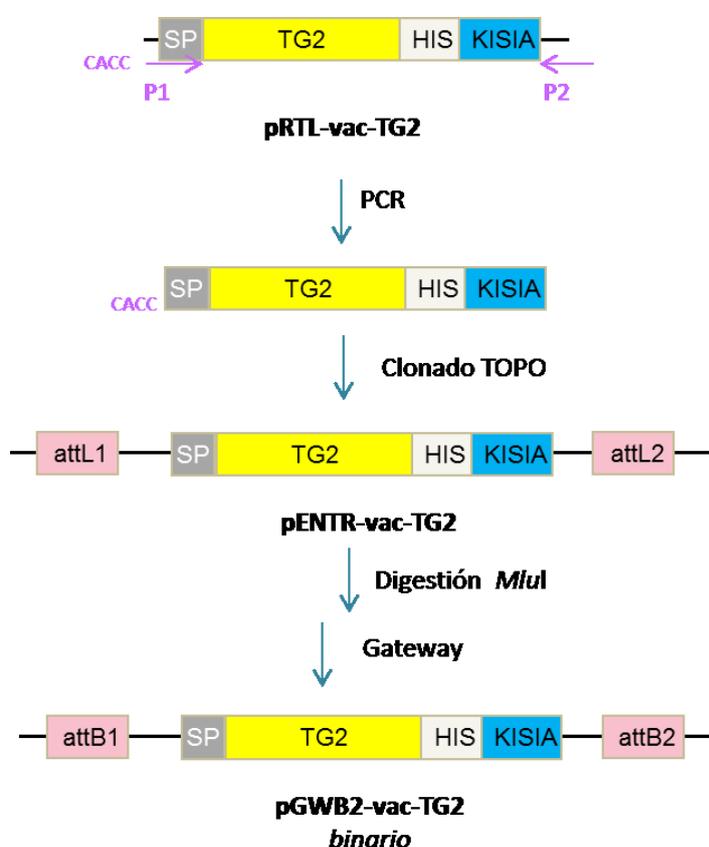
Representación esquemática de las construcciones de TG2 disponibles en el laboratorio: Cyto-TG2 es una versión citosólica de TG2. Sec-TG2, ER-TG2 y vac-TG2 fueron introducidas a la vía secretoria con un péptido señal (SP) de una cadena gamma de anticuerpo de ratón; SEKDEL, señal de retención en ER; KISIA es una señal de direccionamiento vacuolar de la globulina 11S de amaranto. Cyto-TG2, sec-TG2 y ER-TG2 se encontraban en el vector binario pBLTi, mientras que la versión vacuolar se encontraba en el vector de clonado pRTL. Una de las construcciones objetivo consiste en la versión vacuolar de TG2 transferida a un vector binario de expresión en plantas. El segundo objetivo es generar una fusión N-terminal de RFP a ER-TG2 que también será transferida al vector binario. El esquema no está dibujado a escala.

2007) por lo que en primer lugar había que reemplazar los genes reporteros por el gen codificante a TG2 y luego transferir el *cassette* al vector binario pBLTi 121 (Pagny y col. 2000). Para facilitar la detección y purificación se introdujo una secuencia codificante para un *tag* de 6 histidinas en el extremo 3' del gen codificante para TG2. La representación esquemática de las construcciones empleadas en este estudio se presenta en la Figura 1. Las construcciones pBLTi-cyto-TG2, pBLTi-sec-TG2 y pBLTi-ER-TG2 estaban disponibles en el laboratorio al inicio de este trabajo y se caracterizan por poseer el doble promotor del virus de mosaico del Coliflor (CaMV 35S), y la señal de terminación de la transcripción del gen de nopalina sintasa (Nos) de *Agrobacterium tumefaciens*.

Para dirigir TG2 a la vía secretoria se utilizó la secuencia codificante para un péptido señal (SP) secretorio en el extremo 5' proveniente de una inmunoglobulina G de ratón (Restrepo y col. 1990) que funciona correctamente en plantas. Para producir las versiones reticular y vacuolar se introdujeron en el extremo 3' del gen de TG2 las secuencias codificantes para SEKDEL y KISIA (Petruccelli y col. 2007) respectivamente. En este trabajo se obtuvo vac-TG2 en un vector binario y la construcción reportera RFP-TG2. El subclonado en el vector pBLTi era dificultosa y lenta por lo que se decidió cambiar al vector binario pGWB2 (Nakagawa y col. 2007) con la tecnología Gateway™ desarrollada por Invitrogen que emplea un gen letal y clonasaas específicas que eliminar el *background* que se genera por una digestión incompleta del vector binario o religación del mismo. El esquema seguido para estos subclonados se presenta en la Figura 2.

En primer lugar se subclonó vac-TG2 en pENTR™/D-TOPO ® (Invitrogen, SA). Para ello se amplificó la secuencia de TG2 con los *primers* P1 y P2 de manera de incorporar la secuencia CACC en el extremo 5' y conservar la secuencia de direccionamiento subcelular ubicada en el extremo 3' del gen codificante para la fusión TG2-His y el producto de amplificación fue clonado direccionalmente en este vector, obteniéndose pENTR-vac-TG2. Tanto el vector pENTR como pGWB2 tienen el gen de selección que otorga resistencia a kanamicina, por lo que se digirió pENTR-vac-TG2 con la enzima de restricción *MluI* que libera el origen de replicación del plásmido, disminuyendo de esta manera el *background*. El fragmento que contenía la construcción de

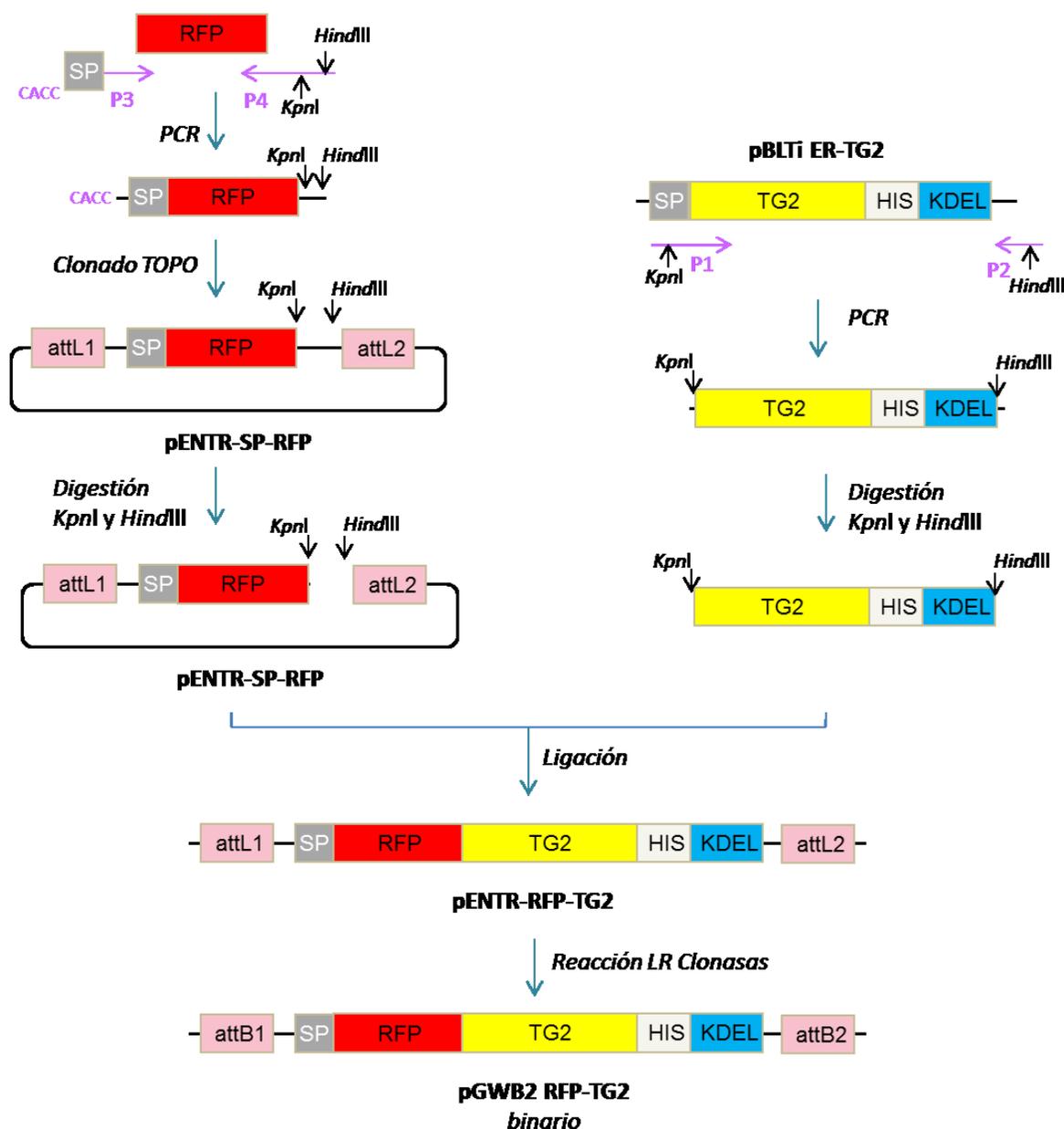
interés entre los sitios attL1 y attL2 se utilizó como vector de entrada para la reacción de las clonasas LR del sistema Gateway y pGWB2 como vector de destino (Nakagawa y col. 2007). Como producto de dicha reacción se obtuvo la construcción vacuolar de TG2 en el vector pGWB2-vac-TG2. Cabe destacar que la transcripción de los genes introducidos en el vector pGWB2 al igual que los que se encuentran en el vector pBLTi también está controlada por el doble promotor CaMV 35S y la señal de terminación de la transcripción del gen Nos y que la principal diferencia es que los genes clonados en el pBLTi conservan la región 5' UTR (*untranslated region*) de la poliproteína de Tobacco Etch Virus en cambio el pGWB2 utiliza el 5' UTR de CaMV 35S.



**Figura 2. Estrategia de clonado utilizada para obtener pGWB2-vac-TG2**

Se muestra un esquema de la estrategia de clonado utilizada para obtener la versión vacuolar de TG2 en vector binario. Se partió del vector de clonado pRTL-vac-TG2 de donde se amplificó vac-TG2 por PCR con un par de primers que introducen la secuencia CACC en el extremo 5' y luego se clonó por sistema TOPO al vector de clonado pENTR-D<sup>TM</sup>/TOPO<sup>®</sup> obteniendo la construcción pENTR-vac-TG2. Este plásmido se digirió con *MluI* para eliminar el origen de replicación del vector. La siguiente reacción fue una recombinação con el sistema Gateway<sup>®</sup> en los sitios attL1 y attL2 del pENTR con el plásmido pGWB2 dando como resultado el vector binario pGWB2-vac-TG2. El esquema no está dibujado a escala.

El segundo objetivo fue obtener la fusión a la proteína fluorescente roja (RFP), para lo cual se diseñó la estrategia de clonado cuyo esquema se presenta en la Figura 3. Como se observa en la figura, en primer lugar se amplificó la secuencia codificante para RFP con un par de *primers* que introducen la secuencia CACC y el SP en el extremo 5', y los sitios de restricción *KpnI* y *HindIII* en el extremo 3'. El producto de amplificación se clonó direccionalmente en el vector pENTR™/D-TOPO® obteniéndose el plásmido pENTR-SP-RFP. Para fusionar TG2 en el extremo 3' del gen codificante para RFP, se utilizó como molde pBLTi-ER-TG2 y se amplificó por PCR la secuencia de interés con el par de *primers* P1 y P2 que introducen los sitios *KpnI* en el extremo 5' y el *HindIII* en el 3'. A continuación, tanto el producto de amplificación por PCR como el vector pENTR-SP-RFP fueron digeridos con las enzimas de restricción *KpnI* y *HindIII*, los fragmentos obtenidos fueron purificados y ligados para obtener el plásmido pENTR-ER-TG2. Este producto se digirió con *MluI* para eliminar el origen de replicación realizándose la reacción con las clonasas LR con el vector destino pGWB2 como se detalló anteriormente obteniéndose pGWB2-RFP-TG2.



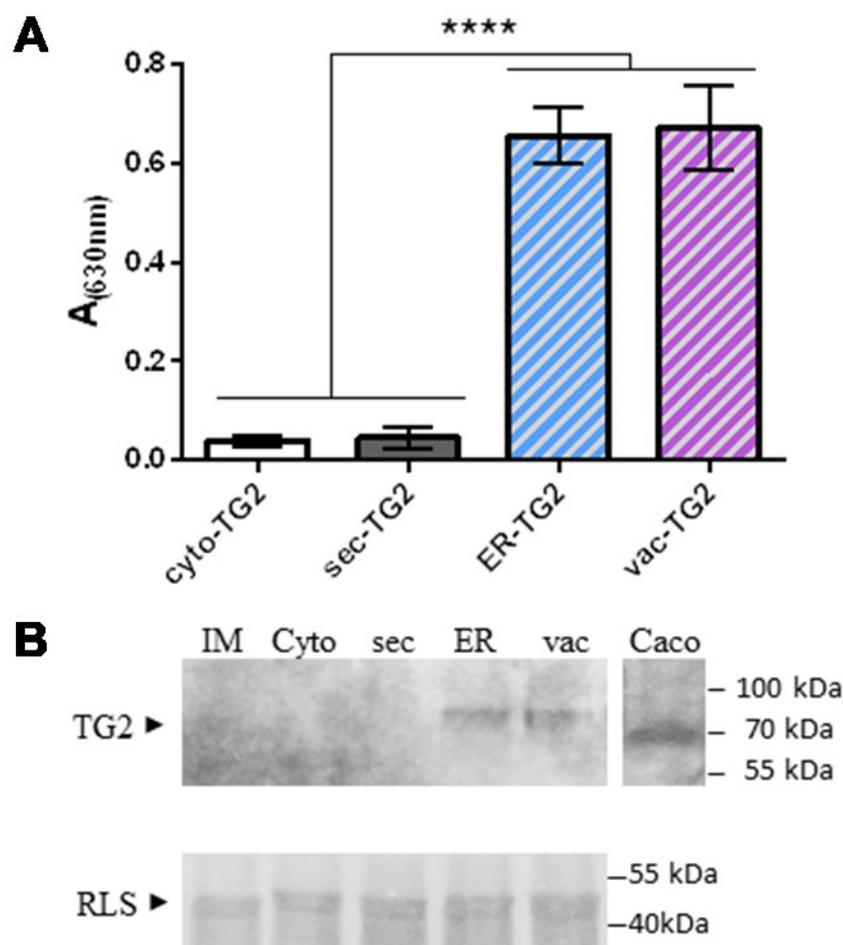
**Figura 3. Estrategia de clonado utilizada para obtener pGWB2-RFP-TG2**

Para obtener la fusión de RFP a ER-TG2 en primer lugar se amplificó por PCR el gen codificante para RFP con los primers P3 y P4 que introducen la secuencia CACC y el SP en el extremo 5' y los sitios de restricción *KpnI* y *HindIII* en el 3'. El producto se clonó direccionalmente al vector pENTR™/D-TOPO®. En paralelo se amplificó por PCR, ER-TG2 con un par de primers que introducen los mismos sitios de restricción mencionados en los extremos. El producto de la PCR y pENTR-SP-RFP se digirieron con dichas enzimas y se ligaron los fragmentos purificados obteniendo el plásmido pENTR-RFP-TG2. La construcción se transfirió al vector binario pGWB2 mediante la reacción de recombinación del sistema Gateway obteniendo pGWB2-RFP-TG2. El esquema no está dibujado a escala.

## 1.2 Efecto del direccionamiento en los rendimientos de TG2.

Se analizó la expresión de las diferentes versiones de TG2 en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Para ello, las cuatro construcciones de TG2 se introdujeron en *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, y se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con suspensiones de estas agrobacterias. Se cosecharon las muestras tomando discos de 5 hojas transformadas y se extrajeron las proteínas solubles. Se determinó la cantidad de TG2 por ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal (mAb) 2G3 (Di Niro y col. 2005). La Figura 4.A muestra que los niveles más altos de acumulación se obtuvieron para ER-TG2 y vac-TG2, mientras que los niveles cyto-TG2 y sec-TG2 fueron aproximadamente 9-16 veces menores. No se observaron diferencias significativas entre ER-TG2 y vac-TG2, lo que sugiere que la fusión C-Terminal a las secuencias SEKDEL o KISIA, resulta igualmente eficaz para aumentar los niveles de acumulación de TG2.

Con el objetivo de estudiar la integridad de las proteínas producidas se analizaron extractos de hoja total por inmunoblot utilizando el mAb 2G3 (Figura 4.B). Como control positivo también se sembró en el gel un extracto total de células Caco-2 (células de adenocarcinoma de colon humano). Las versiones Cyto-TG2 y sec-TG2 no fueron detectadas, mientras que las variantes ER-TG2 (81,4 kDa) y vac-TG2 (81,2 kDa) tuvieron el tamaño esperado, sugiriendo que ambas versiones se acumularon en las hojas en forma estable. La cantidad de proteínas cuantificadas por inmunoblot, seguida por análisis de densitometría mostró diferencias significativas en los niveles de acumulación de ER-TG2 y vac-TG2 en buena correlación con el test de ELISA. Estos resultados confirman que aunque TG2 es una proteína de citosol, la acumulación en retículo endoplásmico y vacuola fue significativamente mayor y por lo tanto de aquí en adelante se trabajó con estas dos versiones. También demuestran un buen reconocimiento por parte del anticuerpo monoclonal 2G3 y que la proteína se mantiene íntegra en dichos compartimentos.

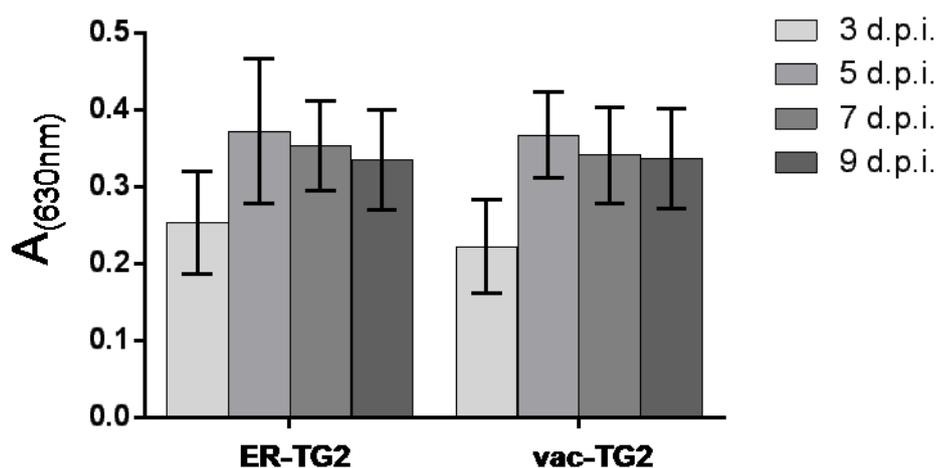


**Figura 4. Impacto de diferentes señales de localización celular en los rendimientos de TG2.**

Determinación de la cantidad de TG2 por ELISA (A). Cada fosa fue sensibilizada con igual cantidad de extracto de hoja conteniendo las diferentes versiones de TG2 y se reveló con el mAb 2G3. Para este ensayo se realizaron 3 replicados biológicos, cada replicado contiene 5 discos de tejido transformado con las diferentes construcciones de diferentes plantas. Las barras de error representan el error estándar de la media. \*\*\*\*Muestra una diferencia estadísticamente significativa por el test de comparaciones múltiples de Tukey's ( $p < 0.001$ ). Análisis de la expresión de TG2 por inmunoblot (B). Se sembraron en un gel extractos totales de las hojas expresando las diferentes versiones de TG2 y como control negativo se utilizó un extracto de hojas infiltradas con el medio de infiltración (MI). Como control positivo se utilizó un extracto de células Caco-2. Los niveles de expresión fueron medidos por densitometría de los inmunoblot desarrollados con el anticuerpo monoclonal 2G3 con 3 experimentos independientes. La cantidad de extracto total se ajustó utilizando la subunidad grande de RuBisCO (RLS) teñida con Coomassie Brilliant Blue R-250 como control de siembra.

Para que la comparación realizada entre los niveles de acumulación de ER-TG2 y vac-TG2 sea válida era necesario demostrar que ambas versiones poseen una cinética de expresión similar. Por este motivo se realizó un estudio temporal de la expresión analizando la acumulación a diferentes tiempos post-

infiltración. Para ello, se coinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con una  $DO_{600}$  de 0,3 de agrobacterias llevando las versiones reticular o vacuolar de TG2 y  $DO_{600}$  0,1 de agrobacterias llevando el PTGS p19, y se tomaron muestras a los 3, 5, 7 y 9 días post-infiltración (dpi). Se extrajeron las proteínas solubles de todas las muestras y se determinó la cantidad de TG2 por ELISA con el mAb 2G3. Los resultados se presentan en la Figura 5, donde se puede observar que para ER-TG2 y vac-TG2 a los 3 dpi los niveles de acumulación son inferiores que a los días 5, 7 y 9, no existiendo diferencias significativas para estos últimos entre sí. En base a estos resultados se concluyó que la cinética de expresión es similar para ambas versiones de TG2 y teniendo en cuenta que no se produce un incremento en el almacenamiento para tiempos superiores a los 5 dpi, se decidió que de aquí en adelante las muestras se cosechen a los 5 dpi.



**Figura 5. Cinética de expresión de ER-TG2 y vac-TG2**

Se cosecharon muestras de hojas transformadas con las construcciones de TG2 a los 3, 5, 7 y 9 días post-infiltración. Se midió cantidad de TG2 por ELISA utilizando el mAb 2G3. Cada fosa fue sensibilizada con igual cantidad de extracto de hoja durante toda la noche a 4 °C. Después del bloqueo, se incubó con el anticuerpo monoclonal 2G3 seguido de una incubación con un anti-ratón conjugado con biotina, luego con estreptavidina conjugada con HRP y por último se reveló con TBM como sustrato. Se midió absorbancia a 630 nm. Para este ensayo se realizaron 3 replicados biológicos, cada replicado contiene 5 discos de tejido transformado de diferentes plantas. Las barras de error representan el error estándar de la media.

## 2. Producción de una molécula que facilite la recuperación de TG2

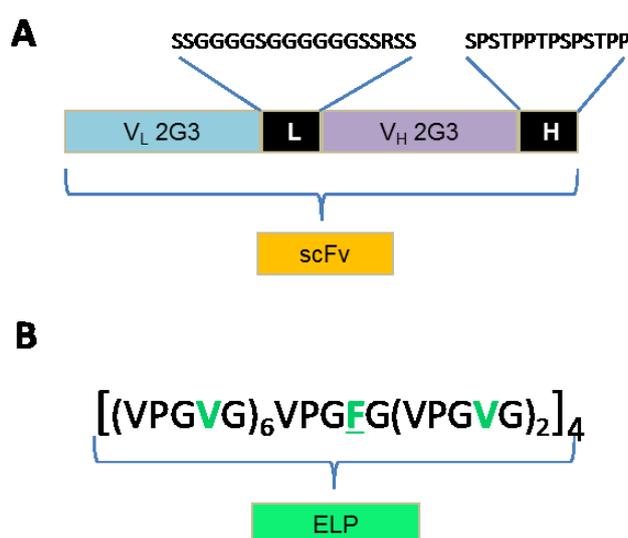
### 2.1 Diseño y construcción de moléculas que permitan realizar una precipitación selectiva de TG2

Para que un sistema de expresión sea rentable no sólo es importante producir la proteína a un bajo costo sino también purificarla de una manera económica. Debido a que los rendimientos de ER-TG2 y vac-TG2 alcanzados son bajos y la recuperación empleando cromatografía de afinidad por unión a níquel era ineficiente por las bajas concentraciones en que se encuentra TG2 en los extractos, se planteó desarrollar un método más eficiente. Para ello se decidió generar una molécula que tuviera por un lado la capacidad de reconocer específicamente TG2 y por otro lado poseyera características de solubilidad que permitieran su separación de otras proteínas. Para el reconocimiento específico se optó por un anticuerpo. Para la separación se decidió utilizar los polímeros similares a elastina (ELP) por la simplicidad en el método de separación y su impacto en los rendimientos (Floss y col. 2009, Floss y col. 2013).

El anticuerpo fue clonado a nivel molecular por la Dra. Camila María Scabone empleando como material de partida ascitis de un hibridoma que expresaba el mAb 2G3 generado por el Dr. Fernando Chirido (Di Niro y col. 2005). Se clonaron las secuencias codificantes para las regiones variables livianas y pesadas de este anticuerpo y fueron fusionadas empleando una secuencia codificante para el linker largo SSGGGGSGGGGGSSRSS. De esta forma se obtuvo el scFv 2G3 que fue expresado en *E. coli* comprobándose su capacidad de reconocer específicamente TG2 (Scabone 2012). Posteriormente, el Lic. Hilario Cafiero modificó el gen codificante para este scFv 2G3 para expresarlo en plantas, introduciendo por un lado sitios de restricción que permitieran fusionarlo a diferentes secuencias de direccionamiento y por otro la secuencia que codifica para la región bisagra de una inmunoglobulina A (SPSTPPTPSPSTPP) (Cloutier y col. 2001) para darle flexibilidad a la molécula y evitar que las diferentes fusiones planeadas para generar la molécula de captura afecten su funcionalidad (Figura 6.A) (Cafiero 2012). Los sitios de restricción introducidos permitieron fusionarlo a las

secuencias codificantes para un péptido señal secretorio en el extremo 5' y para un *tag* de 6 histidinas y la secuencia de retención en el ER, SEKDEL en el extremo 3'. Además, se introdujeron los sitios de restricción *PfI*MI y *Bgl*I en los extremos *upstream* y *downstream* de gen scFv 2G3, respectivamente, para facilitar una estrategia de clonado recursiva que permitió multimerizar fácilmente esta secuencia o bien otros genes a los que se le desee fusionar.

El ELP diseñado para este trabajo está formado por 36 repeticiones del pentapéptido VPGXG donde X es V:F en proporciones 8:1 ELP(V8F)36 (180aa, 15kDa) (Figura 6.B). La composición de aminoácidos se definió teniendo en cuenta la escala de hidrofobicidad determinada por Urry y col. (1992) (Urry 1992) de forma que la temperatura de transición teórica (Tt) sea inferior a 25 °C, lo que produciría una molécula insoluble en las condiciones de crecimiento de *Nicotiana benthamiana*. Esto se logró con la introducción del aminoácido hidrofóbico fenilalanina. El otro factor importante en el diseño de la molécula es el número de unidades pentaméricas y para definirlo se tuvo en cuenta el trabajo de Conley y col. (2009) que demuestra que 30-40 unidades son el mejor compromiso para lograr altos rendimientos en plantas con una molécula de tamaño suficiente para experimentar la transición de fase y precipitar (Conley y col. 2009). La secuencia nucleotídica del ELP fue optimizada en cuanto al uso de codones y contenido de GC específico de *N. benthamiana*, además de los sitios de restricción *PfI*MI, *Bgl*I para facilitar las fusiones y multimerizaciones y los sitios *Nco*I, *Kpn*I y *Bam*HI para facilitar su clonado en el marco de lectura con las secuencias de direccionamiento mencionadas anteriormente. Este gen



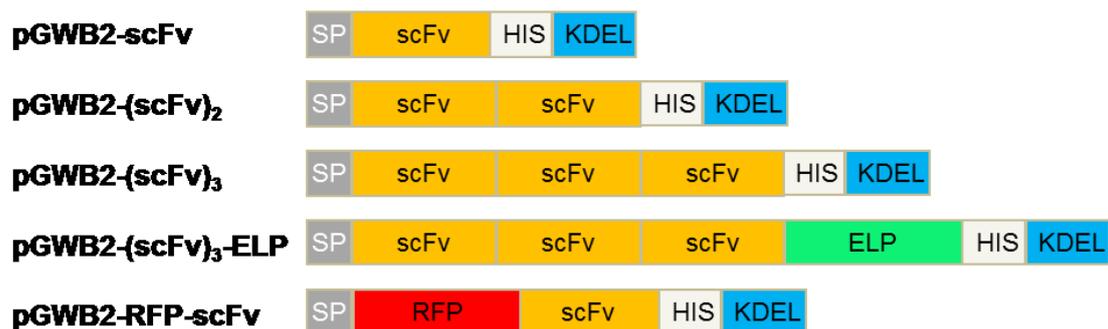
**Figura 6. Esquemas de las construcciones scFv y ELP(V8F)36**

Representación esquemática de la construcción scFv del anticuerpo 2G3 (A) que posee las regiones variables de la cadena liviana (V<sub>L</sub> 2G3) y pesada (V<sub>H</sub> 2G3) del mAb 2G3 unidas por el linker largo (L) cuya secuencia se aclara en el esquema. En el extremo 3' de la construcción se introdujo una secuencia codificante para la región bisagra de una IgA (H). En la parte B se muestra un esquema reducido de la secuencia de aminoácidos del polímero similar a elastina ELP(V8F)36 que posee una relación V:F de 8:1 en el aminoácido X. Los esquemas no están dibujados a escala.

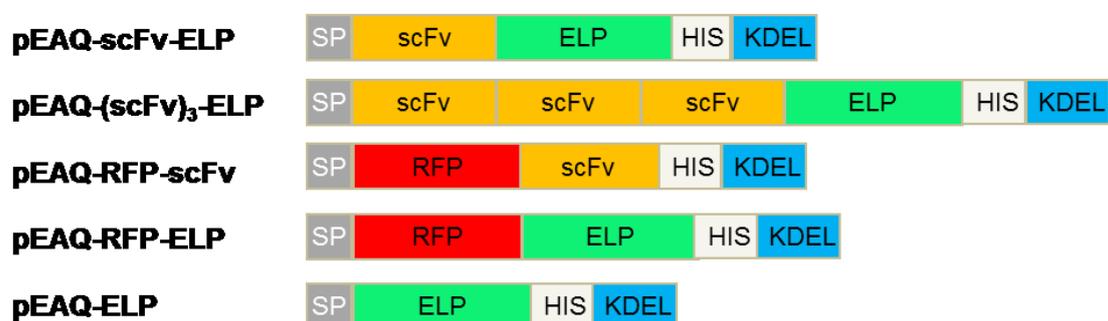
sintético fue suministrado por GenScript Biotech Corp (China).

Con el fin de disponer de moléculas de captura de alta avidéz que pudieran unir TG2 aunque se encontrara en muy bajas concentraciones se planteó generar formas monoméricas: scFv (308 aa, 33 kDa), diméricas: (scFv)<sub>2</sub> (594 aa, 63 kDa) y triméricas: (scFv)<sub>3</sub> (880 aa, 93,5 kDa) del anticuerpo simple cadena (Figura 7) que fueron inicialmente obtenidas en los plásmidos empleados para la multimerización, pCR2.1 TOPO y pCR8/GW/TOPO, y luego transferidas al vector binario de expresión en plantas pGWB2 (Cafiero 2012). Por otro lado, el gen sintético ELP(V8F)<sub>36</sub> suministrado por la empresa que lo sintetizó en pUC57, fue también subclonado en los vectores pCR2.1 TOPO, pCR8/GW/TOPO y pGWB2 en colaboración con el Lic. Gonzalo Acevedo para generar pGWB2-ELP (208 aa, 18kDa) que contiene las secuencias de direccionamiento y *tag* de His para ser expresado en plantas (Acevedo 2012) (Figura 7). Para el presente trabajo se generaron cuatro nuevas construcciones en el vector pEAQ-DEST1: (scFv)-ELP (442 aa, 42,8 kDa) (scFv)<sub>3</sub>-ELP (1066 aa, 109 kDa), RFP-scFv (543 aa, 59,3 kDa), RFP-ELP (443 aa, 44,5 kDa) y ELP ( 208 aa, 18 kDa) (Figura 7), las dos primeras para unir TG2 y separarla por precipitación selectiva y las últimas para disponer de moléculas reporteras que facilitarían la detección en los ensayos de expresión y recuperación. El vector binario pEAQ-DEST 1 posee los 5' y 3' UTR del RNA2 de CPMV (*cowpea mosaic virus*) (CPMV) en la región de clonado del gen de interés y el gen codificante para el supresor de silenciamiento TBSV-p19 (*Tomato Bushy Stunt Virus*) (Baulcombe y col. 2002) dentro del T-DNA, que de acuerdo a los resultados publicados permitiría obtener rendimientos similares a los vectores replicativos (Sainsbury y col. 2009, Sainsbury y col. 2011). A continuación se presentan las estrategias de subclonado utilizadas partiendo de los plásmidos disponibles en el laboratorio antes mencionados.

### Construcciones disponibles



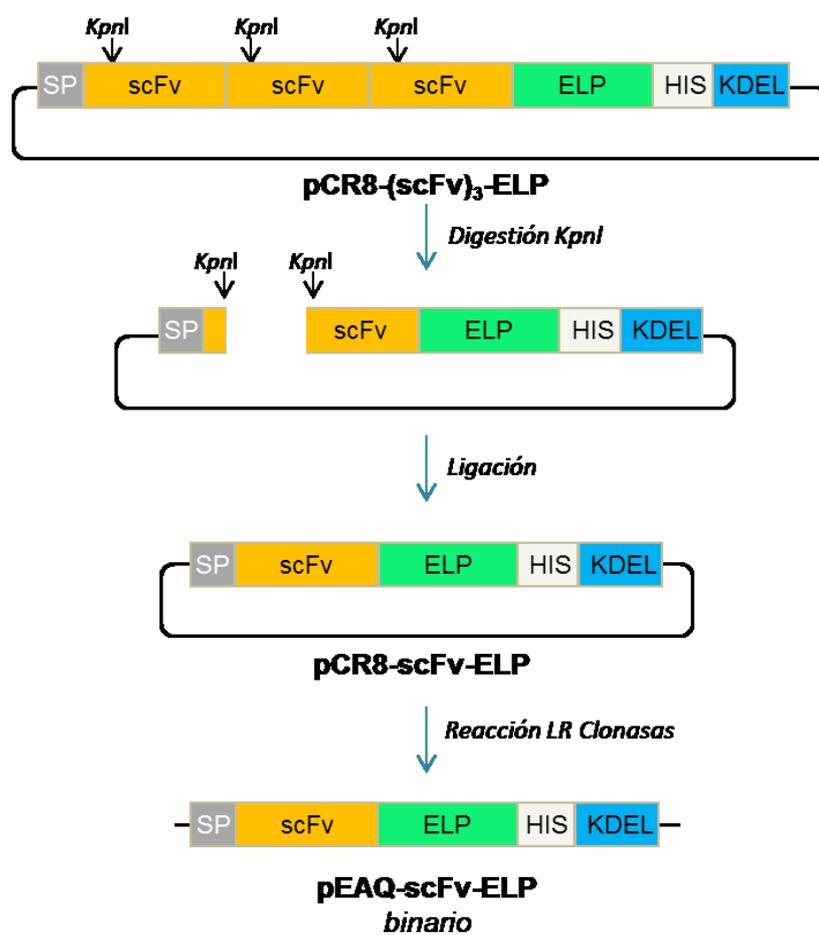
### Construcciones obtenidas



**Figura 7. Esquemas de las construcciones empleadas para unir y capturar TG2**

Representación esquemática de las diferentes versiones del scFv 2G3 disponibles en el laboratorio para expresar en plantas. Todas las construcciones poseen el mismo péptido señal (SP) que en la Figura 1 para introducir las proteínas en la vía secretoria, un *tag* de histidinas (HIS), y la señal de retención en el ER (SEKDEL). RFP y ELP representan las secuencias codificantes para la proteína reportera roja y el ELP. El esquema no está dibujado a escala.

Para obtener el plásmido pEAQ-scFv-ELP se siguió la estrategia detallada en la Figura 8. Se partió del pCR8-(scFv)<sub>3</sub>-ELP que contiene en cada secuencia de scFv un sitio de restricción *KpnI*, lo que permite liberar dos secuencias completas de scFv y que al ser religado genera el pCR8-scFv-ELP. Este plásmido se utilizó como vector de entrada para la reacción de clonasa LR con el pEAQ-DEST1 como vector destino, obteniéndose como resultado la construcción pEAQ-scFv-ELP.



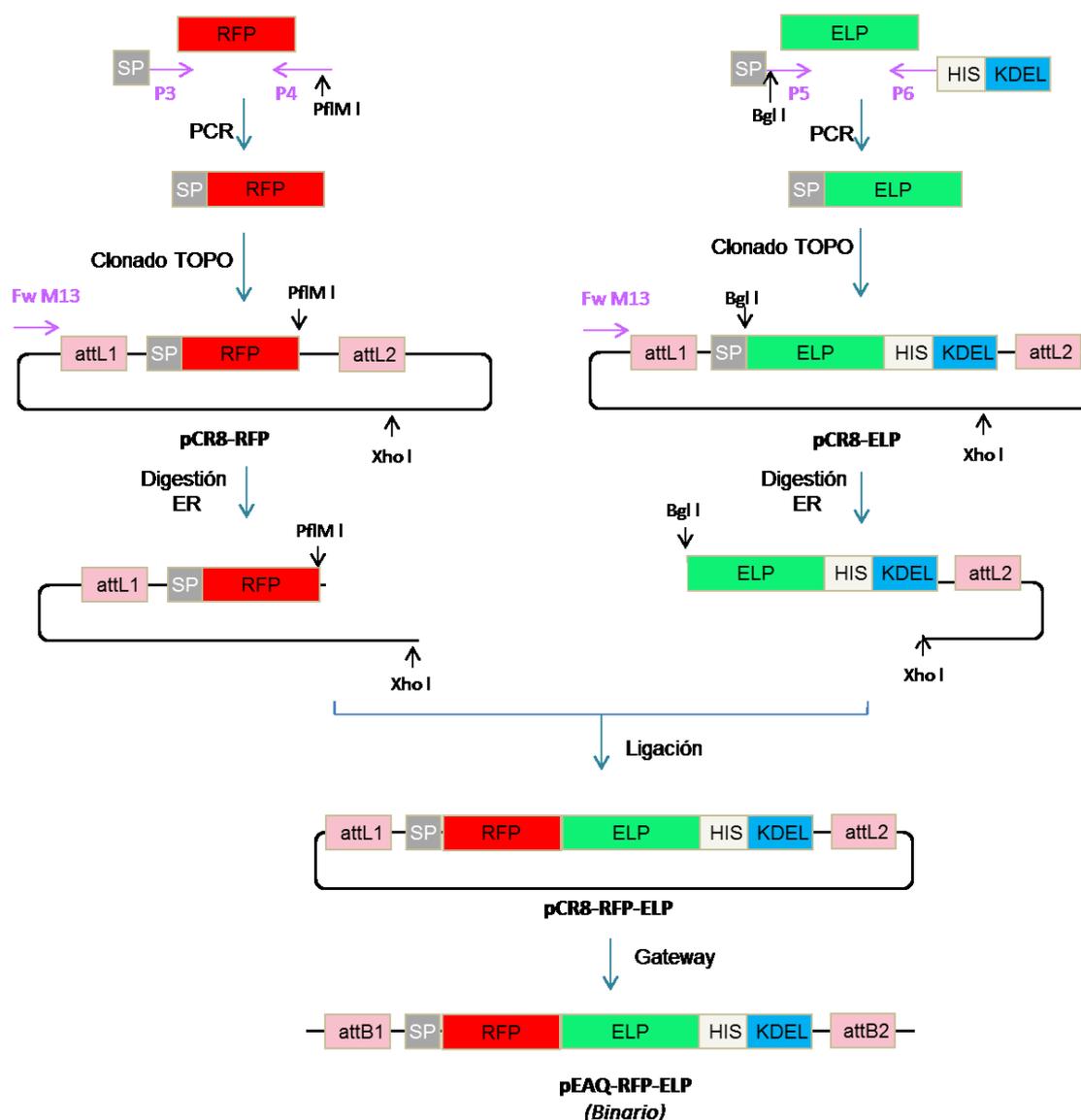
**Figura 8. Estrategia de clonado seguida para obtener el vector pEAQ-scFv-ELP**

Se partió del vector pCR8-(scFv)<sub>3</sub>-ELP que fue digerido con la enzima de restricción *KpnI* de manera que se liberen dos secuencias completas de scFv y se recupera el fragmento de mayor tamaño que contiene la fracción restante de la construcción y el plásmido completo. El fragmento tiene extremos compatibles por lo cual se liga consigo mismo de manera de reconstruir el gen codificante para scFv obteniendo la construcción pCR8-scFv-ELP. Este plásmido se utilizó como vector de entrada para la reacción de las clonasa LR del sistema Gateway utilizando como vector de destino pEAQ1 de manera de obtener la construcción en el vector binario pEAQ-scFv-ELP. El esquema no está dibujado a escala.

Para generar el plásmido reportero pEAQ-RFP-ELP se empleó la estrategia detallada en la Figura 9. En primer lugar se amplificó la secuencia codificante para la RFP con *primers* que permitieran adicionar la secuencia codificante para el péptido señal en el extremo 5' y el sitio de restricción *BglI* en el 3'. El producto se clonó en el vector pCR8/GW/TOPO por el sistema TOPO seleccionándose por PCR aquellos clones que poseían el inserto orientado correctamente. Por otro lado, se amplificó por PCR el gen codificante para ELP utilizando el par de *primers* P5 y P6 que introducen en el extremo 5' la secuencia del SP y el sitio de restricción para *BglI*, y en el 3' las secuencias

codificantes para el *tag* de histidinas y la señal de retención en ER. Este producto también fue clonado en el vector pCR8/GW/TOPO seleccionándose aquellos plásmidos en que el gen tenía la orientación deseada. En la última etapa de esta estrategia los genes RFP y ELP son fusionados empleando una estrategia muy eficiente de subclonado que denominamos “Ligación Recursiva Direccional por Reconstrucción Plasmídica” y que fue descrita en la tesis de grado del Lic. Gonzalo Acevedo. Esta estrategia aprovecha que las enzimas de restricción *Bgl*I y *Pfi*MI producen extremos cohesivos compatibles y evita el *background* que generan las digestiones incompletas de los vectores de partida y las religaciones. Como se muestra Figura 9, pCR8-RFP fue digerido con *Pfi*MI y *Xho*I, mientras que pCR8-ELP con *Bgl*I y *Xho*I de forma de generar dos fragmentos cuyos tamaños permitían lograr una buena separación de vectores parcialmente digeridos y cuyos extremos permitían una ligación direccional. Una vez obtenido el vector pCR8-RFP-ELP se utilizó como vector de entrada para la reacción con las clonasa LR empleando el pEAQ-DEST1 como vector destino y generando de esta forma el vector, pEAQ-RFP-ELP.

Por último, también se obtuvo la construcción pEAQ-ELP realizando una reacción Gateway entre el vector pCR8-ELP generado como intermediario en el clonado de pEAQ-RFP-ELP y el vector destino pEAQ-DEST1.



**Figura 9. Estrategia de clonado seguida para obtener pEAQ-RFP-ELP**

A la izquierda se muestra una amplificación inicial por PCR de la secuencia codificante para RFP utilizando los primers P3 que contiene la secuencia del péptido señal (SP) fusionada al extremo 5' y P4 que incorpora la secuencia reconocida por la enzima de restricción *PflM1*.

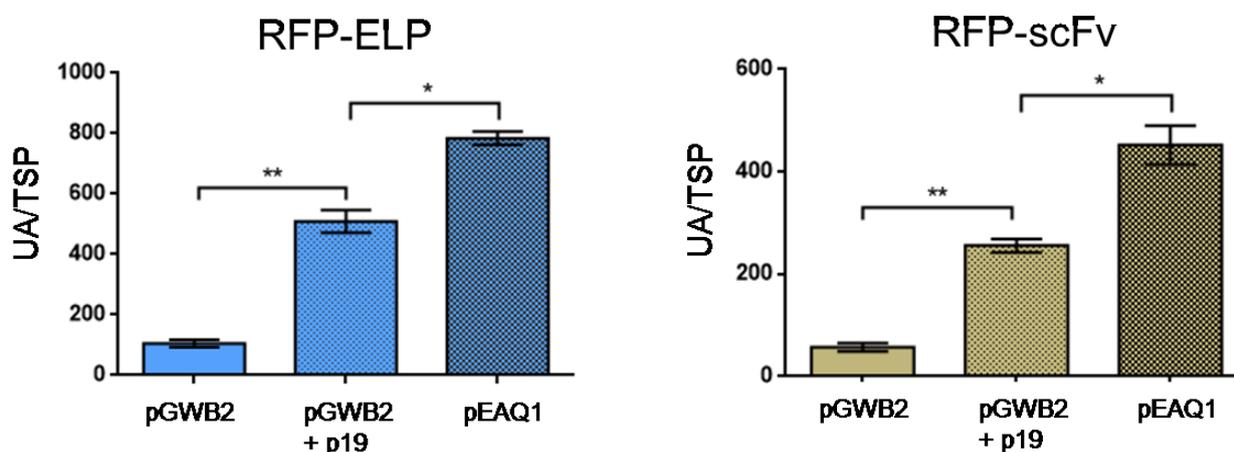
A la derecha se muestra una amplificación por PCR de la secuencia codificante para ELP en la que se utilizaron los primers P5 que introduce la secuencia de SP y el sitio de restricción de *BglI* y P6 que fusiona al extremo 3' la secuencia codificante para el *tag* de histidinas y la señal de retención en retículo endoplásmico SEKDEL. Los productos de PCR se clonaron por el sistema TOPO al vector comercial pCR8/GW/TOPO de manera no direccional. Se seleccionaron los clones que contienen la direccionalidad correcta por PCR con los primers Fw M13 y P4 para RFP o P6 para ELP. Se obtuvieron de esta manera las construcciones pCR8-RFP y pCR8-ELP. Para generar la fusión se utilizó el sistema de Ligación Recursiva Direccional por Reconstrucción Plasmídica. Para ello se digirieron ambos plásmidos con las enzimas de restricción *PflM1* o *BglI* y *XhoI* como se indica en la figura y se ligaron los fragmentos indicados para obtener la construcción pCR8-RFP-ELP. El plásmido obtenido se utiliza como vector de entrada para la reacción de clonación LR del sistema Gateway y pEAQ-DEST1 como vector destino para obtener la construcción en el vector binario pEAQ-RFP-ELP. El esquema no está dibujado a escala.

## 2.2 Expresión de la molécula de captura scFv-ELP en hojas de *N. benthamiana*

El estudio de la expresión en plantas de las distintas formas multiméricas del scFv y ELP se inició utilizando las construcciones en el vector binario pGWB2 generadas por el Lic. Hilario Cafiero (Cafiero 2012) y el Lic. Gonzalo Acevedo (Acevedo 2012) detalladas anteriormente. Se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con suspensiones de agrobacterias llevando la construcción con DO<sub>600</sub> entre 0,1 y 0,6 y se cosecharon muestras a 3, 5, 7 y 9 dpi, siempre coinfiltrada con DO<sub>600</sub> 0,1 de agrobacterias llevando el plásmido pBIN-TBSV-p19. Se realizaron extractos totales y se reveló por inmunoblot contra el *tag* de histidinas, sin embargo no se logró detectar la proteína en ninguna de las condiciones ensayadas. Fue entonces que se decidió cambiar al vector binario pEAQ generándose las construcciones que llevan la molécula de captura y reporteras descritas en la sección anterior. Además se generaron versiones reporteras conteniendo el gen de RFP lo que permitió analizar la expresión más fácilmente. Estas construcciones fueron introducidas en *A. tumefaciens* GV3101 y se realizaron ensayos de expresión temporal empleando plantas jóvenes de *N. benthamiana* que fueron infiltradas en las hojas 3, 4 y 5 (numerando como hoja 1 la primera empezando de arriba) con al menos cinco plantas diferentes para cada construcción de forma que la posición de la hoja no sea una variable a ser considerada y haciéndose este experimento en tres ensayos independientes. Las muestras se cosecharon a los 5 dpi combinándose los discos de hojas provenientes de plantas diferentes infiltradas con la misma construcción, se extrajeron proteínas y se determinó la cantidad de RFP por medida de fluorescencia ( $\lambda_{exc}$  590nm/ $\lambda_{em}$  645nm) y proteínas totales. La Figura 10 presenta las intensidades de fluorescencia relativas obtenidas para la expresión de pGWB2-RFP-scFv, pEAQ-RFP-scFv, pGWB2-RFP-ELP y pEAQ-RFP-ELP.

Teniendo en cuenta que el pEAQ tiene el gen TBSV-P19 en el T-DNA, la expresión de los reporteros en pGWB2 se estudió en ausencia y en presencia de este supresor agregándose, en este último caso, agrobacterias llevando pBIN-TBSV-P19 (DO<sub>600</sub> 0,1) a la mezcla de infiltración. Los valores de fluorescencia de los genes reporteros RFP-scFv y RFP-ELP en pEAQ, fueron

respectivamente 8,1 y 9,5 veces superiores a los obtenidos para los mismos genes en pGWB2 en ausencia de TBSV-P19, y 1,8 en ambos casos si se incorpora TBSV-P19. Teniendo en cuenta estos resultados, se siguió trabajando con las construcciones en pEAQ.

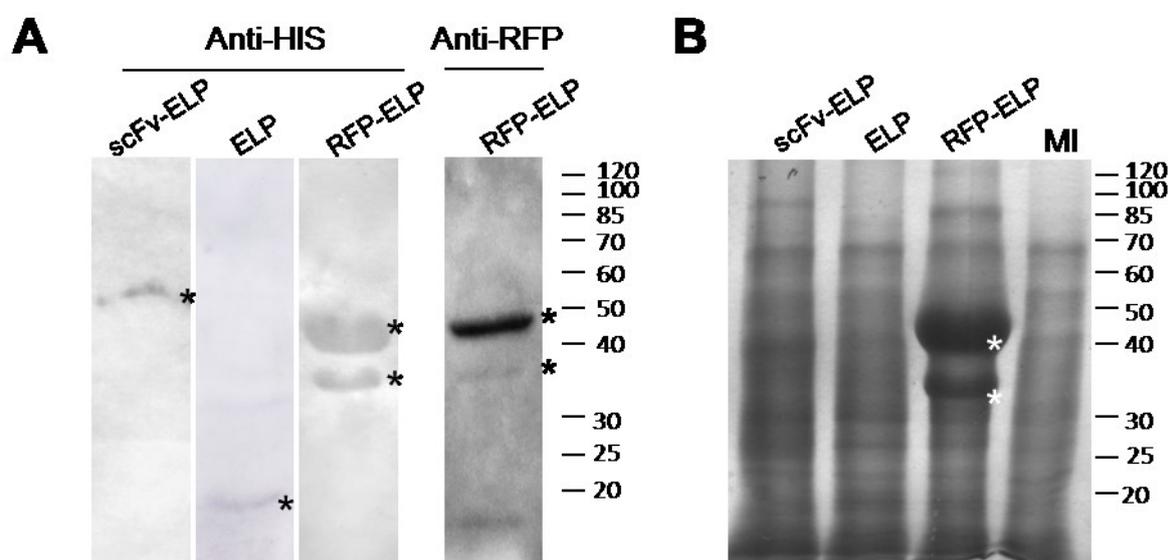


**Figura 10. Expresión de RFP-ELP y RFP-scFv en los vectores pGWB2 y pEAQ-DEST1**

Se extrajeron las proteínas solubles de hojas transformadas con las agrobacterias llevando las construcciones RFP-ELP (A) y RFP-scFv (B), se midió fluorescencia de los extractos realizados a los 5 días post-infiltración y se cuantificaron las proteínas totales por BCA. Se grafican las medias de unidades arbitrarias de fluorescencia respecto de las proteínas totales solubles medidas (UA/mg TSP), las barras de error representan el error medio estándar. Los asteriscos individuales y dobles indican que los valores son significativamente diferentes en un test de Tukey,  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente.

La expresión de la molécula de captura pEAQ-scFv-ELP y de los controles pEAQ-RFP-ELP y pEAQ-ELP se estudió empleando un diseño experimental similar al anterior. Las muestras fueron cosechadas a los 5 dpi extrayéndose proteínas totales empleando el *buffer* muestra SDS-PAGE no reductor e incubando los extractos a 100 °C. Este método de extracción presenta la ventaja de ser muy eficiente y además al emplear condiciones desnaturizantes se minimiza la proteólisis enzimática lo que permite detectar la presencia de proteínas foráneas aun cuando se encuentran en pequeñas cantidades. Sin embargo, la desventaja de este método radica en que el *buffer* contiene SDS en una concentración que interfiere con cualquier método de cuantificación de proteínas por lo que se sembraron volúmenes iguales de cada extracto en dos geles de poliacrilamida: uno de los cuales se utilizó en inmunoblot y el otro fue utilizado para evaluar la cantidad total de proteínas sembrada. El inmunoblot fue revelado con un anticuerpo específico del *tag* de

histidinas (anti-HIS) y en caso de la muestra de RFP-ELP también se reveló con anti-RFP. La Figura 11.A muestra una banda de 50 kDa para la molécula de captura scFv-ELP que es reconocida específicamente por el anti-His y que es de un tamaño similar al esperado (48,5 kDa). El anticuerpo anti-HIS también revela bandas de 45 y 20 kDa para las muestra controles RFP-ELP (44,5 kDa) y ELP (18 kDa) respectivamente que coinciden con los tamaños esperados. La muestra correspondiente a RFP-ELP posee además una banda 37 kDa que es reconocida tanto por el anticuerpo anti-HIS como por anti-RFP, lo que indicaría una hidrólisis parcial. El revelado con el colorante Coomassie Brilliant Blue muestra que la cantidad de proteínas totales fue similar en los diferentes extractos, destacándose las bandas correspondientes a RFP-ELP (Figura 11.B, asteriscos) y que están ausentes en el extracto de hojas infiltradas con el medio de infiltración (MI) utilizado como control. Estas bandas coinciden en tamaño con las detectadas en el inmunoblot, lo cual indica que los niveles de expresión de RFP-ELP son altos. Para las muestras de ELP y scFv-ELP no se distinguen bandas diferenciales respecto del control, por lo cual podemos concluir que se expresan en menor nivel que RFP-ELP. Los inmunoblots



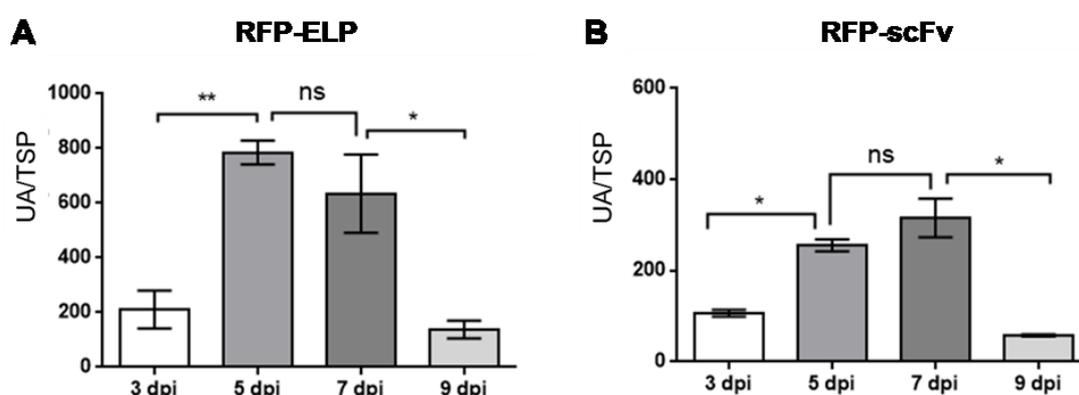
**Figura 11. Estudio de la expresión de la molécula de captura.**

Se infiltraron plantas con agrobacterias llevando la construcción génica de la molécula de captura pEAQ-scFv-ELP y los controles pEAQ-RFP-ELP y pEAQ-ELP y se analizó la expresión por inmunoblot (parte A) revelados con el anticuerpo anti-HIS y anti-RFP, evaluándose también la cantidad de proteína por tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Parte B). Como control se sembró un extracto de hoja infiltrada con el medio de infiltración (MI). Las bandas que corresponden a las proteínas heterólogas introducidas se indican con asteriscos. Los pesos moleculares del patrón se expresan en kDa.

realizados con la construcción pEAQ-(scFv)<sub>3</sub>-ELP dieron negativos, por lo que no se continuo el trabajo con esta molécula. Los niveles de expresión de scFv-ELP, RFP-ELP y ELP se determinaron por ELISA y fueron en promedio  $80 \pm 12$ ,  $450 \pm 23$  y  $84 \pm 15$   $\mu\text{g}$  de proteína recombinante/g de hoja fresca respectivamente.

Estos ensayos permitieron concluir que la molécula de captura scFv-ELP en el vector pEAQ se expresa bien aunque con rendimientos inferiores a RFP-ELP por lo que se continuará el trabajo con esta molécula.

Para definir las condiciones para la expresión de la molécula de captura scFv-ELP y a los efectos de simplificar el estudio de las distintas variables que afectan los rendimientos se realizó una cinética empleando las construcciones reporteras pEAQ-RFP-ELP y pEAQ-RFP-scFv para luego extrapolar los resultados a scFv-ELP. Para las agroinfiltraciones se empleó un diseño experimental similar al detallado al inicio de esta sección evaluándose la expresión por medida de fluorescencia. En la Figura 12 se muestran los niveles detectados de RFP-ELP y RFP-scFv expresados en unidades de fluorescencia respecto de las proteínas totales a los diferentes dpi. Se observa que no hay diferencias significativas entre los niveles obtenidos a los 5 y 7 dpi, mientras que las muestras cosechadas a los 3 y 9 dpi los niveles fueron significativamente inferiores. Estos ensayos permitieron definir que una concentración de bacterias de DO<sub>600</sub> 0,4 y tiempo de cosecha de hojas a los 5-7 dpi fueron las mejores condiciones de agroinfiltración.



**Figura 12. Cinética de expresión de pEAQ-RFP-ELP y pEAQ-RFP-scFv**

Se extrajeron las proteínas solubles de hojas transformadas con las agrobacterias llevando las construcciones RFP-ELP (A) y RFP-scFv (B), se midió fluorescencia de los extractos realizados a los 3, 5, 7 y 9 días post-infiltración y se cuantificaron las proteínas totales por BCA. Se grafican las medias de unidades arbitrarias de fluorescencia respecto de las proteínas totales solubles medidas (UATSP), las barras de error representan el error medio estándar. Los asteriscos individuales y dobles indican que los valores son significativamente diferentes en un test de Tukey,  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente.

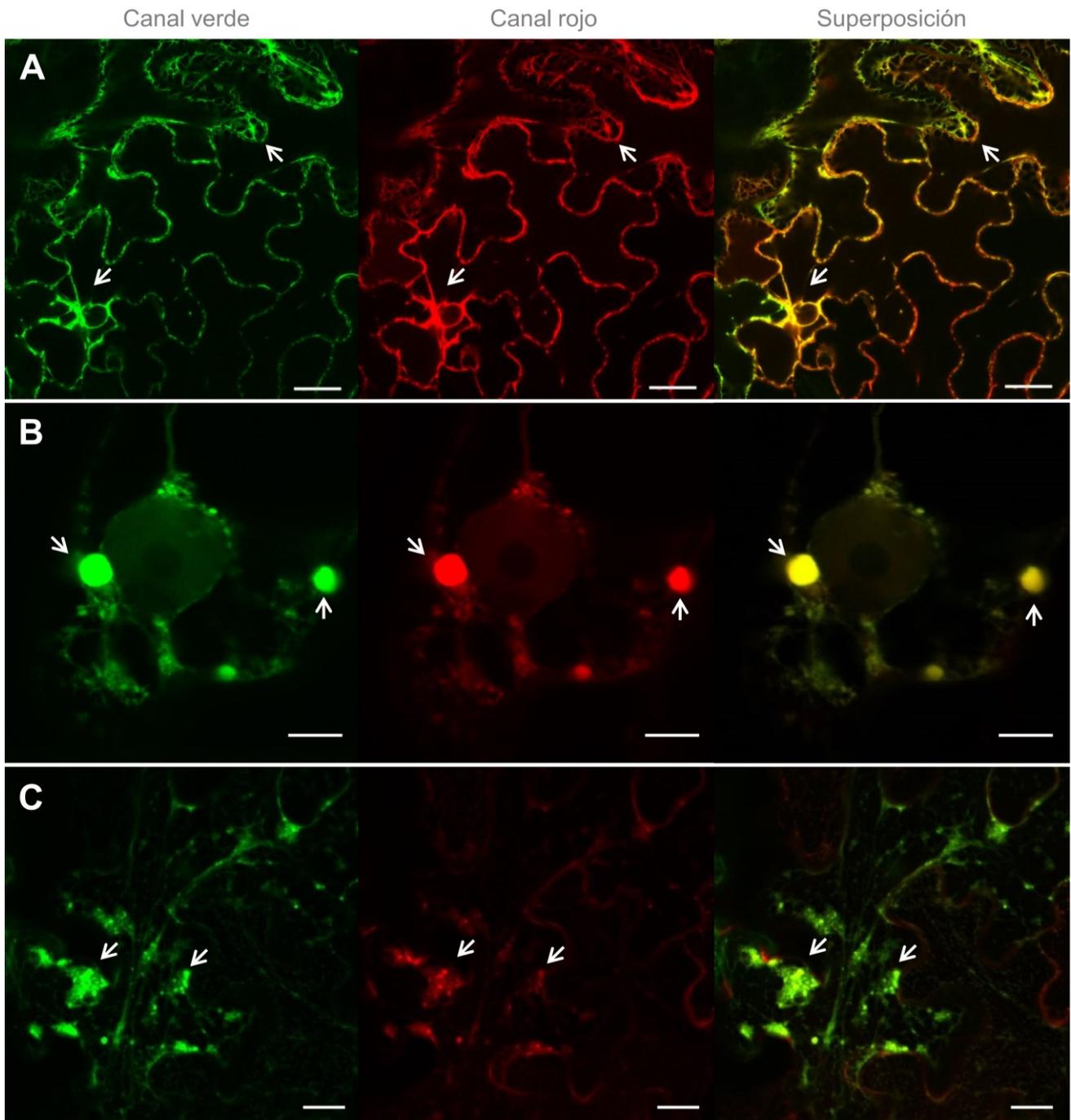
### 3. ELP como inductor de la formación de cuerpos proteicos en el retículo endoplásmico

Las proteínas foráneas fusionadas a ELP (ELPiladas) se producen con mayores rendimientos que las mismas moléculas no ELPiladas (Conley y col. 2009, Floss 2009, Conrad y col. 2011, Phan y col. 2013). Este fenómeno se atribuye a que la fusión estabilizaría la molécula por hacerla menos accesible a las proteasas debido a la tendencia a la agregación que tiene este *tag*. Sin embargo, podría haber otro factor que contribuya a los mayores rendimientos como la capacidad de los ELP de inducir la formación de cuerpos proteicos (PB, por *protein bodies*) dentro del retículo endoplásmico de células vegetales. Los PB se observaron por primera vez en semillas de monocotiledóneas siendo las estructuras donde se almacenan prolaminas y otras proteínas insolubles por lo que se trata de compartimientos donde las proteínas están protegidas de la degradación (Herman y Larkins 1999). Si la formación de este tipo de estructuras dentro del ER generara un microambiente estable, no sería necesario que el ELP-*tag* esté fusionado a la proteína foránea sino que el ELP estabilizaría a la proteína foránea en “*trans*” por formación de este tipo de compartimiento, es decir sin estar unido directamente a la molécula de interés. Con el objetivo de contrastar esta hipótesis en primer lugar se estudió la capacidad del ELP(V8F)36 de inducir la formación de PB y en segundo lugar se estudió el impacto en los rendimientos.

#### 3.1 Estudio de la capacidad el ELP(V8F)36 de inducir la formación de cuerpos proteicos en el ER

Se sabe que la capacidad de inducir la formación de PB no sólo está relacionada con la localización subcelular donde se expresa el ELP sino que también depende de las condiciones de expresión (Conley y col. 2009). Es por ello que en primer lugar se estudió la capacidad de RFP-ELP de inducir la formación de PB en hojas por microscopía confocal láser de barrido (CLSM). En este ensayo se emplearon como controles los marcadores fluorescentes de la vía secretoria sec-RFP (Scabone y col. 2011) que se secreta al apoplasto y

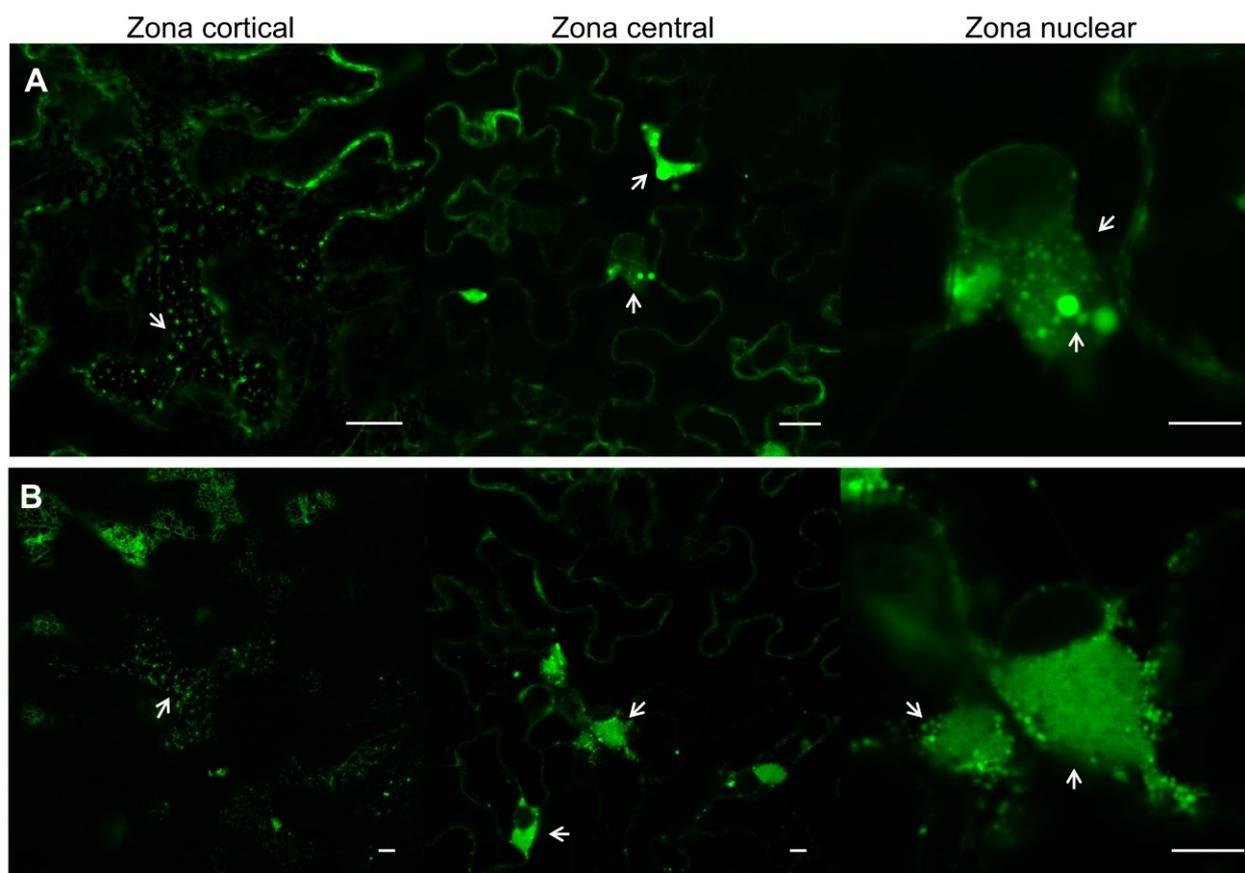
GFP-HDEL (Haseloff y col. 1997) que es retenido en el ER. Estos controles fueron seleccionados para evaluar la estructura del ER en ausencia del ELP. En la Figura 13.A se muestra las micrografías de células de la epidermis de hoja agroinfiltradas con las construcciones reporteras GFP-HDEL y sec-RFP, donde se observa que GFP-HDEL presenta un patrón típico de retículo endoplásmico caracterizado por una red en la zona cortical de la célula, mientras que en el plano central se observa fluorescencia alrededor del núcleo y en el borde de la célula. También se observa que sec-RFP se localiza en los bordes de la célula con un patrón irregular típico de una acumulación de apoplasto, con una fracción de moléculas en tránsito dando señal dentro del ER (flechas). Las Figuras 13.B y 13.C presentan las zonas nuclear y cortical respectivamente de hojas infiltradas con una mezcla de agrobacterias llevando la construcción pEAQ-RFP-ELP y el reportero GFP-HDEL. En el canal rojo se observan los PB dentro de la red del ER tanto para la zona nuclear (Fig 13.B flechas) como en la cortical (Figura 13.C, flechas). A pesar de que se esperaba observar los PB principalmente en el canal rojo donde se detecta RFP-ELP, en el canal verde también se detectaron estas formaciones y en la superposición de canales se observa que la misma es completa (zonas amarillas). Este resultado indicaría que los PB inducidos por RFP-ELP alterarían la estructura completa del ER, hecho que está de acuerdo con el gran dinamismo de este compartimiento.



**Figura 13. Estudio de la capacidad de RFP-ELP para inducir la formación de cuerpos proteicos en el ER**

Expresión de sec-RFP y GFP-HDEL (A), RFP-ELP y GFP-HDEL (B zona nuclear y C zona cortical) en células epidérmicas de *N. benthamiana*. En el panel A se muestra como control GFP-HDEL coexpresado con sec-RFP, donde se observa que GFP-HDEL (canal verde) presenta un patrón típico de retículo endoplásmico señalado con flechas, mientras que sec-RFP (canal rojo) muestra colocalización con GFP-HDEL, lo que representa a la proteína que se está sintetizando y transportando, y también presenta señal en la zona del apoplasto. RFP-ELP coexpresado con GFP-HDEL muestra la formación de cuerpos proteicos señalados con flechas en la zona nuclear (B) y la zona cortical (C) que pueden observarse tanto en el canal verde como en el rojo. Los tamaños de barra representan 20µm en A y C, y 10 µm en B.

Verificada la capacidad de RFP-ELP de inducir la formación de PB en el ER y habiendo observado que GFP-HDEL también se localizó en estos cuerpos, se analizó si la molécula de captura scFv-ELP y el ELP también afectaban la estructura del ER de esta forma. Para ello, se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con agrobacterias llevando estas construcciones y el marcador de interés. Para la coexpresión de ELP con GFP-HDEL (Figura 14.A) se detectaron los PB típicos esperados dentro del ER, con un rango de tamaños amplio (1-7  $\mu\text{m}$  aprox.) señalados con flechas. En la zona cortical los PB son principalmente de tamaño pequeño y se encuentran dispersos, a diferencia de lo observado para RFP-ELP. En las zonas del núcleo y bordes celulares se detectaron cúmulos que se ven como zonas menos densas que los PB, pero con estas estructuras en su interior. Para el caso de scFv-ELP se observaron estructuras muy similares a las obtenidas para ELP en la zona cortical (Figura 14.B), mientras que para la zona nuclear y bordes celulares se encontraron grandes estructuras más homogéneas que las de ELP y con pequeños PB alrededor. Estos cambios en la estructura del ER demuestran que ambas construcciones se expresan correctamente y cumplen con las características esperadas.



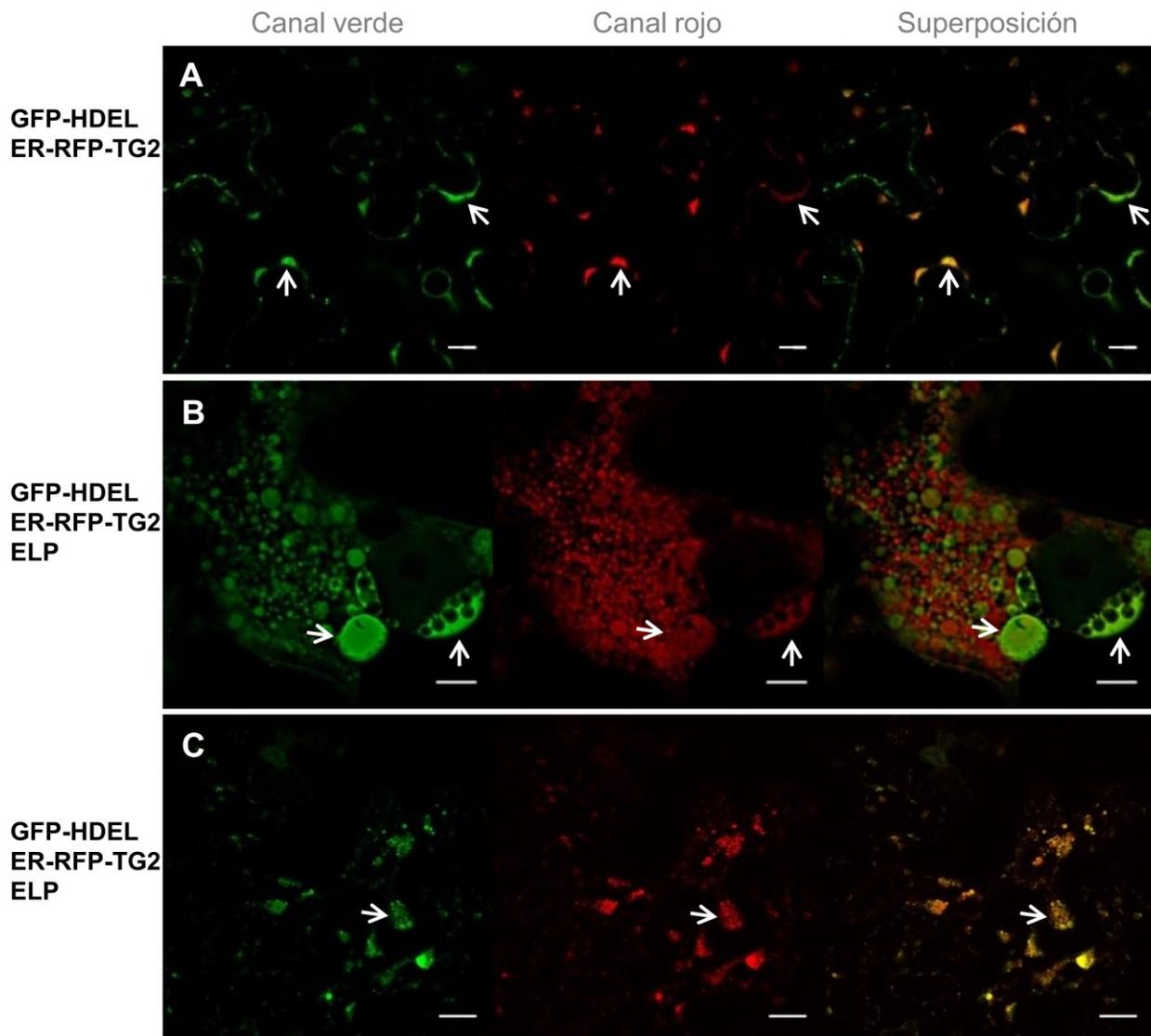
**Figura 14. Efecto de ELP y scFv-ELP en la estructura del ER**

Se muestran células epidérmicas de *N. benthamiana* coexpresando GFP-HDEL con ELP(A) y scFv-ELP (B). Se muestran las zonas cortical, central y nuclear para ambos experimentos donde se indican con flechas los cúmulos inducidos por estas construcciones. Los tamaños de barra representan 20 $\mu$ m para las zonas cortical y central, y 10  $\mu$ m en la zona nuclear.

### 3.2 Efecto del ELP sobre la síntesis de TG2 en hojas de *N. benthamiana*

Habiendo verificado que las distintas versiones de ELP ensayadas inducían la formación de PB en el ER, se estudió si ocurría lo mismo en hojas que expresaran TG2. En primer lugar se evaluó si la versión reportera de TG2 (ER-RFP-TG2) era incorporada a los PB inducidos por ELP como ocurre con GFP-HDEL. Para ello, se analizaron por CLSM muestras de hojas expresando ER-RFP-TG2 y GFP-HDEL, en presencia o no de ELP. ER-RFP-TG2 presentó un patrón reticular con cúmulos en los bordes de las células (Figura 15.A, flechas). GFP-HDEL, cuya localización normal se encuentra uniformemente distribuida a lo largo del ER, tuvo un patrón reticular más intenso que ER-RFP-TG2 con presencia también en los cúmulos de los bordes celulares. Se observó

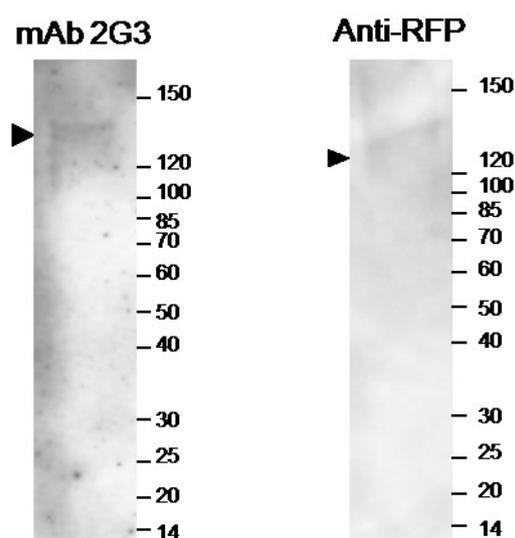
una colocación parcial entre GFP-HDEL y ER-RFP-TG2 en el panel de superposición, pero se diferenciaron en que ER-RFP-TG2 se localizó principalmente en los cúmulos, mientras que la GFP-HDEL tuvo una distribución más homogénea (Figura 15.A). Cuando ER-RFP-TG2 se coexpresó con ELP, se observaron PB pequeños (menos de 1  $\mu\text{m}$ ) y grandes (Figura 15.B y 15.C), pero sólo se detectó una colocación parcial con GFP-HDEL (Figura 15.B, panel de superposición). Los PB, en la región nuclear, tuvieron una distribución de tamaño y composición heterogéneas, ya que algunos de ellos contenían solamente ER-RFP-TG2 y otros sólo GFP-HDEL. Incluso se pudieron observar círculos sin fluorescencia, que podrían corresponder a PB de bajo recambio proteico que no incorporaron en su formación a las proteínas fluorescentes. En contraste, en la región cortical, se observó una colocación completa de GFP-HDEL PB verde y ER-RFP-TG2 PB rojo (Figura 15.C). Se corroboró de esta manera que ER-RFP-TG2 genera por sí misma una distorsión en el ER, pero también es incorporada a los PB inducidos por ELP. Con estos resultados se decidió evaluar si la acumulación de TG2 se ve modificada por efecto de ELP.



**Figura 15. CLMS para evaluar la integración de ER-RFP-TG2 a los PB inducidos por la expresión de ELP.**

Expresión de ER-RFP-TG2 y GFP-HDEL (A), ER-RFP-TG2, GFP-HDEL y ELP (B zona nuclear y C zona cortical) en células epidérmicas de *N. benthamiana*. GFP-HDEL tuvo un patrón reticular típico (canal verde, A), ER-RFP-TG2 (canal rojo, A) se encuentra principalmente localizado en cúmulos (PB) en los bordes de las células (flechas), y la señal en el resto de la red del ER fue baja. Para ER-RFP-TG2 y GFP-HDEL se observó colocalización principalmente en esos cúmulos. En el panel B se marcó con flechas algunos PB formados en la zona del núcleo donde hay una colocalización parcial. En el panel C se muestra la zona cortical donde la localización de GFP-HDEL y ER-RFP-TG2 es completa. La barra de escala corresponde a 20  $\mu\text{m}$  para A y C, y 10  $\mu\text{m}$  para B.

Para verificar que la localización subcelular determinada por CLMS correspondía a la proteína de fusión intacta ER-RFP-TG2 se realizaron inmunoblots que fueron revelados con anti-TG2 mAb 2G3 y anti-RFP (Figura 16). Ambos anticuerpos revelaron una banda levemente superior al esperado en base a la composición de aminoácidos de 106 kDa, verificando que la versión se encuentra intacta. No se detectaron bandas de tamaño menor al esperado, por lo que no hay degradación. La cuantificación por ELISA ER-RFP-TG2 dio en promedio niveles de 26  $\mu\text{g/g}$  de hoja fresca, mientras que ER-TG2 dio niveles de 9,5  $\mu\text{g/g}$  de hoja fresca. Estos resultados indican que esta proteína se expresa en niveles mayores que ER-TG2 y que se mantiene íntegra, por lo cual la fluorescencia corresponde completamente a la fusión ER-RFP-TG2.

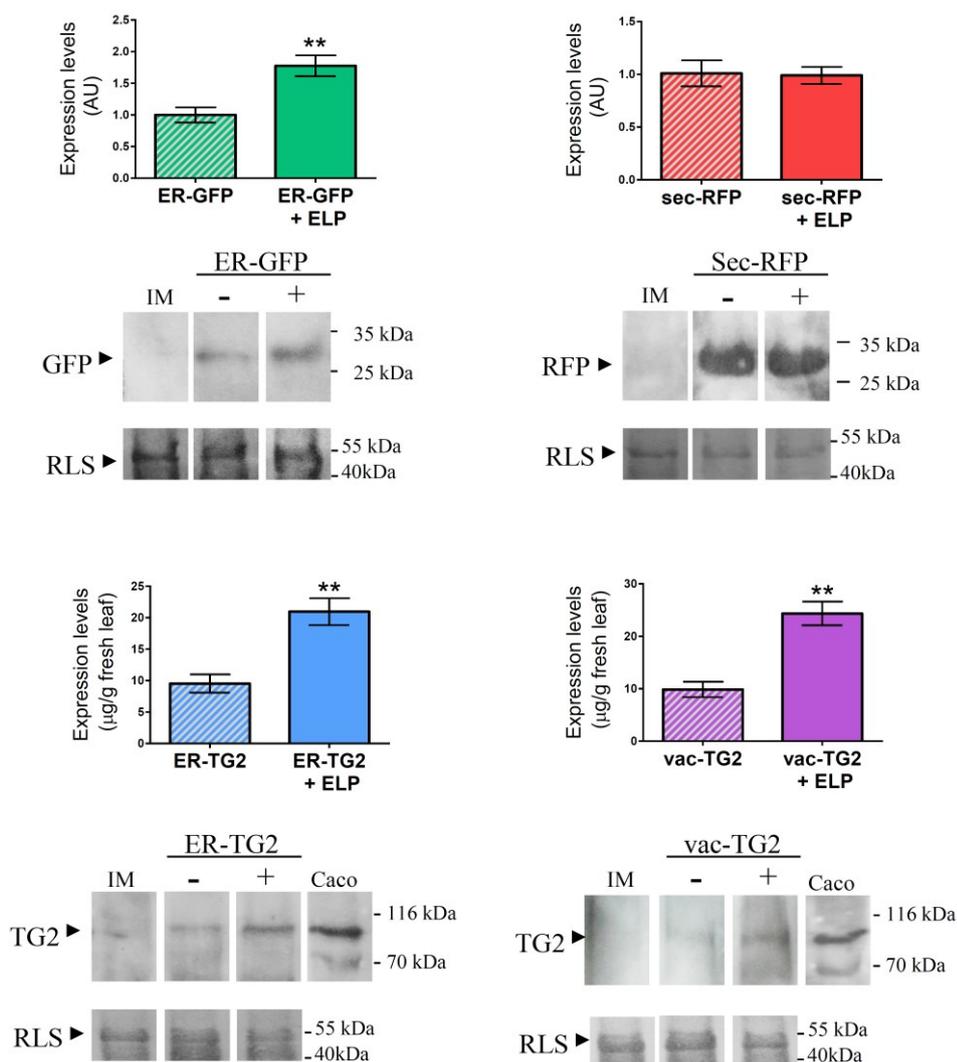


**Figura 16. Estudio de la integridad de ER-RFP-TG2 por inmunoblot**

Se tomaron muestras de hojas expresando ER-RFP-TG2 previamente estudiadas por CLMS y se analizó la integridad de la proteína por inmunoblot. Por un lado se reveló con el mAb 2G3 específico de TG2 y por otro lado con anti-RFP. Las bandas detectadas correspondientes a ER-RFP-TG2 se señalaron con una punta de flecha negra. Los pesos moleculares del patrón se expresan en kDa.

### 3.3 Efecto del ELP en los rendimientos de la proteína recombinante

Habiéndose verificado que los ELP inducen la formación de PB y que las proteínas reporteras GFP-HDEL y RFP-TG2 se encuentran en estas estructuras se analizó si había cambios en los rendimientos. Con esta finalidad se realizó un inmunoblot de extractos de hojas en los que se coexpresó ELP con los reporteros GFP-HDEL y sec-RFP y las versiones de TG2 con las que se habían obtenido mejores rendimientos en la primera parte de este trabajo. Para poder realizar un análisis estadístico, las muestras para este ensayo contenían discos de hojas provenientes de 5 plantas diferentes, expresando transitoriamente las proteínas de interés, en tres experimentos independientes. Se extrajeron las proteínas totales de estas muestras y se sembró en un gel la misma cantidad extracto en cada calle, y como control se muestra la banda correspondiente a la subunidad grande de RuBisCO (RLS) en cada calle. La intensidad de las bandas de GFP, RFP y TG2 fueron cuantificadas por densitometría, como se detalla en la sección de Materiales y Métodos, los resultados obtenidos se presentan en la Figura 17. Los niveles de acumulación de cada proteína foránea obtenidos en presencia y ausencia de ELP se muestran en el gráfico, y en la parte inferior un inmunoblot revelado con anti-GFP, anti-RFP o anti-TG2 mAb 2G3 junto con una tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250 que muestra la cantidad de RLS sembrada. Para GFP-HDEL se observó un aumento de 2.0 veces en el nivel de acumulación por la formación de PB inducidos por ELP, mientras que no se encontraron diferencias significativas en los niveles de sec-RFP (Figura 17, panel superior). Los niveles de acumulación de ER-TG2 y vac-TG2 medidos en ausencia de ELP fueron  $9,5 \pm 1,5$  y  $9,9 \pm 1,4$   $\mu\text{g/g}$  de tejido de hojas frescas respectivamente, y frente a la coexpresión con ELP los niveles de acumulación se incrementaron a  $20,9 \pm 2,1$  y  $24,4 \pm 2,3$   $\mu\text{g/g}$  de tejido de hojas frescas, respectivamente (Figura 17, panel inferior). A raíz de estos resultados, se concluye que ELP puede incrementar los niveles de acumulación de algunas proteínas recombinantes, como por ejemplo las versiones de GFP y TG2 de ER y la versión vacuolar de TG2 pero no producen rendimientos mayores para la proteína secretoria sec-RFP. En el caso particular de TG2, ELP logró un incremento de 2,1 y 2,5 veces en la acumulación de ER-TG2 y vac-TG2, respectivamente.



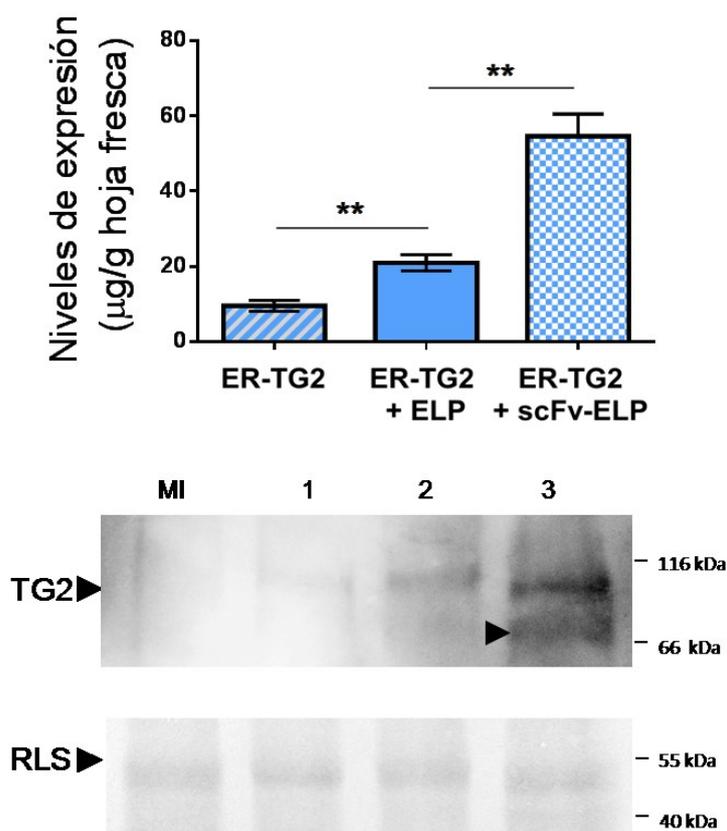
**Figura 17: Efecto de ELP en los niveles de acumulación de GFP-HDEL, sec-RFP y ER-TG2 y vac-TG2.**

Se sembró la misma cantidad de extracto en el gel como se puede observar según la cantidad de Subunidad grande de RuBisCO (RLS) teñida con Coomassie Brilliant Blue R-250. El inmunoblot se desarrolló con anti-GFP, anti-RFP y anti-TG2 mAb 2G3, para GFP-HDEL, sec-RFP y ER-TG2 y vac-TG2, respectivamente. La intensidad de banda se cuantificó utilizando el software ImageJ. Se desarrollaron tres experimentos biológicamente independientes y cada réplica fue obtenida utilizando hojas de 5 plantas diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. \*\*Denota diferencia estadísticamente significativa por el Test de Student ( $P < 0.01$ ).

### 3.4 Efecto de la molécula de captura scFv-ELP en los rendimientos de TG2

Teniendo en cuenta que el ELP incrementó la acumulación de varias proteínas retenidas en la vía secretoria, se planteó como hipótesis que una interacción directa del ELP con la proteína foránea produciría un efecto estabilizador aún mayor. Para testear esta hipótesis se coexpresó ER-TG2 con ELP y con el scFv-ELP, analizándose los niveles de expresión por inmunoblot con un diseño experimental similar al presentado en la sección anterior. En la Figura 18 se observa que los mayores niveles de TG2 se alcanzan en presencia del scFv-ELP siendo de 54,5  $\mu\text{g/g}$  de hoja fresca, lo que representa un incremento de 5,7 veces en relación a la TG2 obtenida en ausencia de ELP. Además, en presencia del scFv-ELP, TG2 presenta dos bandas, siendo la de menor tamaño similar al tamaño de TG2 de células Caco-2. La forma de mayor tamaño se puede atribuir a la incorporación de los oligosacáridos ricos en manosas típico de ER, como se mencionó anteriormente. El scFv-ELP protegería a TG2 de esta glicosilación produciendo la banda correspondiente al tamaño de una versión no glicosilada.

Los resultados presentados en esta sección demuestran que los ELP incrementan los rendimientos de proteínas retenidas en la vía secretoria aun cuando no se encuentren unidos covalentemente a la misma.



**Figura 18: Efecto de scFv-ELP en los niveles de acumulación de ER-TG2.**

Se expresó pGWB2-ER-TG2 en combinación con pBIN-TBSV-P19 (1), pEAQ-ELP (2) o pEAQ-scFv-ELP (3). Se sembró en un SDS-PAGE la misma cantidad de extracto total como se puede observar según la cantidad de Subunidad grande de RuBisCO (RLS) teñida con Coomassie Brilliant Blue R-250 en el panel inferior. Se desarrolló un inmunoblot revelando con anti-TG2 mAb 2G3 y se cuantificó la intensidad de banda por el software ImageJ (panel superior). Se realizaron tres experimentos biológicamente independientes y cada replica fue obtenida utilizando hojas de 5 plantas diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. \*\*Denota diferencia estadísticamente significativa por el Test de Student ( $P < 0.01$ ).

#### 4. Purificación de las moléculas fusionadas a ELP por ciclos de transición inversa

##### 4.1 Análisis de la capacidad de RFP-ELP de experimentar ciclos de transición inversa (ITC)

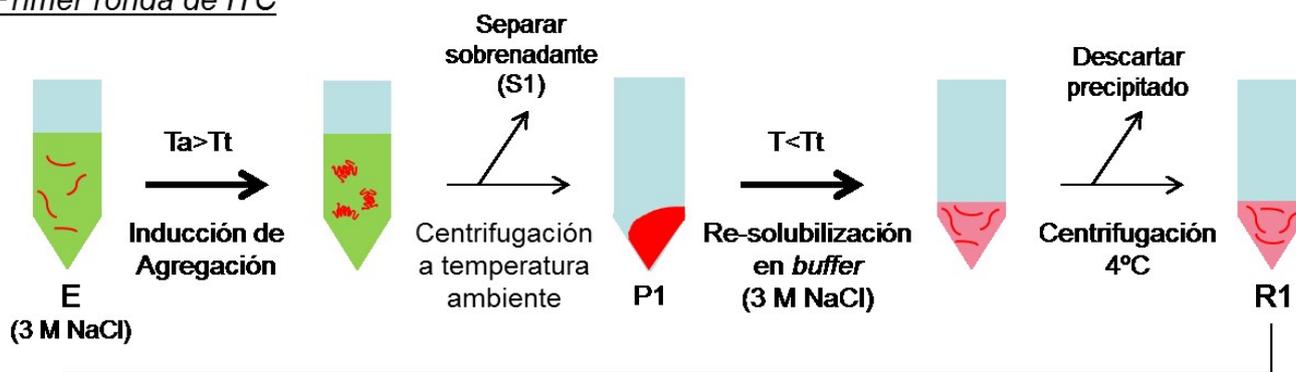
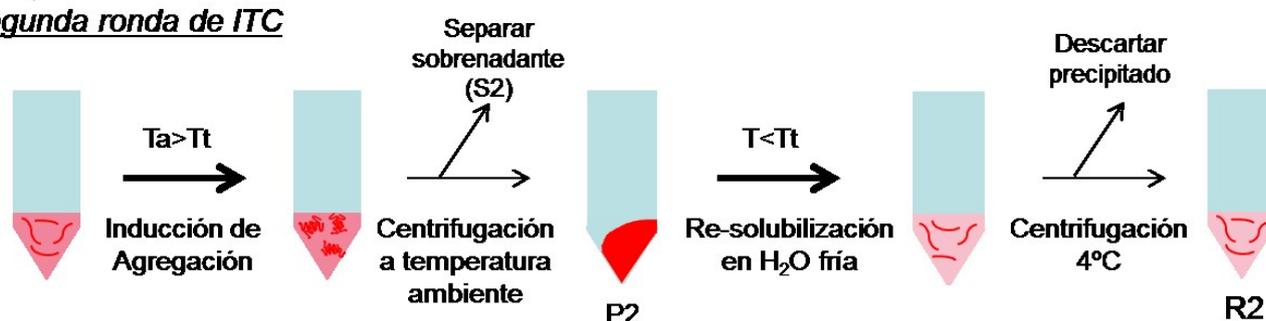
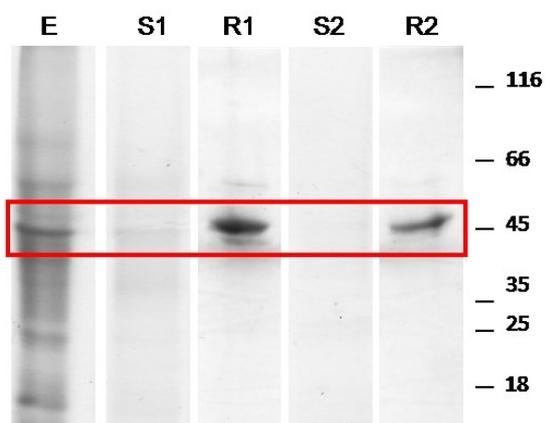
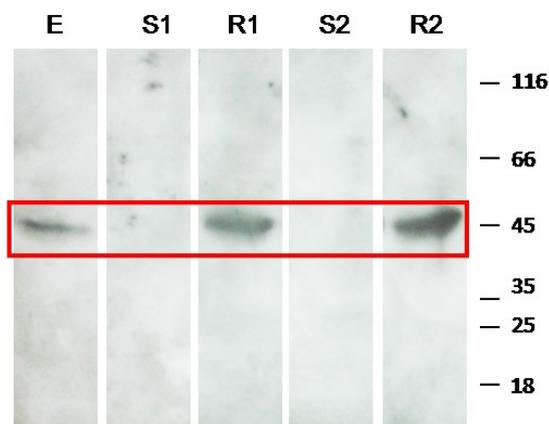
Los ELP tienen la característica de sufrir un cambio de estructura reversible inducido por un cambio en la temperatura, lo cual representa una ventaja para el proceso de purificación. A temperaturas bajas es soluble, mientras que a temperaturas superiores a una temperatura de transición ( $T_t$ ) cambia su estructura formando cúmulos que permanecen insolubles en suspensión, lo cual enturbia la solución. A partir de esta característica se desarrolló el método de purificación basado en ciclos de transición denominado ITC (*inverse transition cycling*) (ciclos de transición inversa), que se denomina inversa porque a mayor temperatura la proteína es menos soluble. El método

consiste en intercalar ciclos de separación de fases a diferentes temperaturas, explotando el cambio de estructura inducido por temperatura que sufre ELP.

La  $T_t$  de un polímero depende de la composición química del ELP, del número de unidades repetitivas y de su concentración. Cuanto menor es el contenido de aminoácidos hidrofóbicos y mayor el de aminoácidos polares y cargados, mayor es la  $T_t$  (Urry 1992). En cuanto a la longitud del polímero, existe un aumento gradual de la  $T_t$  con el incremento del número de unidades repetitivas hasta que se alcanza un máximo a partir del cual ya no se modifica (Smits y col. 2015). La forma de la curva y el número de unidades requeridas para alcanzar el máximo depende también de la composición, por ejemplo para un ELP en que el aminoácido X es V se requieren aproximadamente 120 pentámeros (Smits y col. 2015). En cuanto a la concentración, se requiere de un número mínimo de moléculas para que la agregación produzca una separación de fases por lo que si encuentra a concentraciones muy bajas no hay separación. Además si ELP se encuentra fusionado a una proteína de interés, la misma puede modificar las características fisicoquímicas siendo su agregación más gradual (Conley y col. 2009). Para el caso particular del ELP(V8F)36 la  $T_t$  teórica es 18 °C, estimada en base a una escala desarrollada por Urry y colaboradores (Urry 1992). Esta escala fue determinada con concentraciones de ELP sintético de 40 mg/ml, que son muy superiores a los niveles de expresión obtenidos en plantas. Además, la  $T_t$  depende de las condiciones del medio tales como pH, fuerza iónica y tipo de sal. Teniendo en cuenta estos factores en primer lugar se evaluó si el ELP(V8F)36 es capaz de experimentar transiciones de fase.

Se evaluó la capacidad de la fusión reportera RFP-ELP para sufrir transiciones térmicas empleando el esquema de purificación presentado en la Figura 19.A. Se seleccionó esta molécula porque su detección es más simple y sus niveles de expresión fueron superiores a los de scFv-ELP. La temperatura para inducir la agregación ( $T_a$ ) utilizada fue 40 °C, y se seleccionó teniendo en cuenta que ELP se encuentra fusionado a otra proteína y que se estimaba una concentración de ELP inferior a la condición en la cual se estimó la  $T_t$  teórica. Como se observa en la figura, el primer paso del procedimiento consiste en incubar el extracto crudo adicionado con la sal de manera que alcance una concentración de NaCl 3 M (fracción E) a una temperatura que induzca la

agregación de ELP. Luego de producir el colapso, se centrifugó a temperatura ambiente con el objetivo de precipitar ELP colapsado. El precipitado conteniendo ELP fue resuspendido en un volumen menor al inicial de solución salina fría para revertir la agregación. El último paso de la primera ronda consistió en una centrifugación a 4 °C para separar el ELP soluble de las proteínas insolubles (sobrenadante: fracción R1). Luego se repitió el proceso para efectuar una segunda ronda de purificación, esta vez sin modificar el volumen de la muestra y efectuando la re-solubilización en H<sub>2</sub>O desionizada. El sobrenadante de la centrifugación en frío contiene ELP recuperado con mayor pureza (fracción R2). Las proteínas de las diferentes fracciones se separaron por SDS-PAGE y el gel se tiñó con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Figura 19.B). Por otro lado se desarrolló un inmunoblot revelado con anti-RFP (Figura 19.C). En ambos casos se detectó una banda del tamaño esperado para RFP-ELP tanto en la calle correspondiente al extracto crudo (E), como en las calles R1 y R2 que corresponden a la primer y segunda ronda de purificación respectivamente. Para la tinción con Coomassie en la calle R1 también se detectó una banda del tamaño de la subunidad grande de RuBisCO, considerada impureza, que se elimina con la segunda ronda de purificación. Este resultado demuestra que la construcción reportera RFP-ELP se mantiene íntegra, sufre la transición de fase y que es posible purificarla por ITC.

**A**Primer ronda de ITCSegunda ronda de ITC**B****C****Figura 19. Purificación de RFP-ELP por ITC**

En el panel A se muestra un esquema del sistema de purificación por ITC donde la especie soluble de RFP-ELP se muestra como líneas curvas y la especie que forma los cúmulos como resortes agrupados.  $T_a$  es la temperatura para inducir agregación que fue de 40 °C y  $T$  es la temperatura para re-solubilizar los agregados que fue de 4 °C. La fracción E corresponde al extracto crudo, S1 y S2 a los sobrenadantes de la centrifugación a temperatura ambiente de las rondas 1 y 2 respectivamente, R1 y R2 a los sobrenadantes de la centrifugación a 4 °C de las rondas 1 y 2 respectivamente. Para más detalles véase Materiales y Métodos. Se muestran también un SDS-PAGE teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250 (B) y un inmunoblot revelado con anti-RFP (C) con las fracciones descritas previamente. Se señala con un rectángulo rojo las bandas de RFP-ELP del tamaño esperado (44,5 kDa). El patrón de peso molecular se expresa en kDa.

## 4.2 Ajuste de las condiciones que producen una recuperación mayor de RFP-ELP por ITC

Con el fin de optimizar el proceso de purificación, se modificaron factores que afectan al rendimiento de la purificación por ITC y se analizaron los resultados obtenidos. Uno de los factores a evaluar fue si la  $T_a$  seleccionada para 3 M de NaCl (40 °C) era suficiente para colapsar una fracción mayoritaria de RFP-ELP o si una temperatura superior podría facilitar la recuperación de una mayor cantidad de la proteína de interés. Para ello, se estudió el rendimiento de purificación por ITC si la  $T_a$  seleccionada fuera 60 °C utilizando igual concentración de NaCl. Otro factor a modificar fue el tipo de sal. Para desarrollar esta variante se reemplazó la sal utilizada por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  debido a que se ha reportado que logra disminuir significativamente la  $T_t$  con concentraciones inferiores a las utilizadas para NaCl (Fong y col. 2009). Se evaluó el rendimiento obtenido con concentraciones 0,12 M y 0,25 M, y las  $T_a$  seleccionadas en base a la bibliografía consultada fueron 15 °C (temperatura ambiente) y 30 °C, ambas inferiores a la que se utilizó con NaCl. Los ensayos se realizaron a partir de una muestra conteniendo aproximadamente 0,4 mg/g de hoja fresca de RFP-ELP, por lo cual la concentración de ELP se mantuvo constante. El rendimiento porcentual de la purificación se determinó mediante 2 técnicas diferentes: medida de fluorescencia y densitometría de las bandas obtenidas por inmunoblot. En ambos casos se cuantificó por unidades arbitrarias las señales detectadas en las fracciones purificadas y en la muestra inicial (extracto crudo). Teniendo en cuenta los volúmenes de cada fracción se calculó en porcentaje, la cantidad de RFP-ELP total presente en la fracción pura respecto de la cantidad total medida para la muestra inicial. Para cuantificar las fracciones de proteína purificada y el extracto crudo se utilizó el método del BCA.

Los rendimientos obtenidos para las diferentes condiciones se muestran en la tabla 2, donde se puede apreciar que a pesar de los factores modificados la mejor condición continúa siendo la utilizada anteriormente. Para las condiciones con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se logró mayor rendimiento en la purificación de RFP-ELP a concentraciones 0,25 M que a 0,12 M. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre los experimentos realizados a diferentes

temperaturas. Los rendimientos porcentuales fueron inferiores al 10% en todas las purificaciones con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Para las condiciones evaluadas con NaCl 3 M se detectó que los rendimientos superaban ampliamente los obtenidos con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , alcanzando rendimientos superiores al 50% para la ITC a 40 °C y del 36% para 60 °C. Estos resultados indican que RFP-ELP puede ser purificada por ITC con un rendimiento porcentual superior al 50% utilizando la condición NaCl 3 M a 40 °C, obteniéndose 225  $\mu\text{g}$  de RFP-ELP purificado por cada gramo de hoja fresca (Tabla 2). Se puede observar en la Figura 10.B la tinción por Coomassie Brilliant Blue R-250 de las fracciones obtenidas en una purificación equivalente, donde se muestra que la calle R2 contiene únicamente la banda correspondiente a RFP-ELP indicando un alto nivel de pureza. También se observó que la utilización de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no constituyó una mejora en la purificación de RFP-ELP. Cabe destacar que en todos los casos se obtuvieron valores comparables de rendimiento porcentual medidos por las dos técnicas de determinación utilizadas, indicando que para la purificación con scFv-ELP podrá determinarse el rendimiento por densitometría del inmunoblot.

Otra alternativa evaluada fue la utilización de una membrana de acetato de celulosa para retener los cúmulos como alternativa a la centrifugación. Se utilizó una concentración de NaCl 3M y las temperaturas evaluadas fueron 40 y 60 °C. Sin embargo, en ninguna de las condiciones estudiadas se lograron retener los cúmulos por lo cual se descartó esta variante de ITC.

**Tabla 2. Efecto de la naturaleza y concentración de la sal en la recuperación de una proteína reportera por ITC**

Tipo de sal	Concentración de sal	Temperatura (°C)	Rendimiento		
			% por Inmunoblot *	% por Fluorescencia**	$\mu\text{g}$ RFP-ELP/g de hoja fresca***
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,12 M	15	5,0 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 1,5	20,1 $\pm$ 1,9
		30	5,3 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 1,7	21,1 $\pm$ 2,0
	0,25 M	15	9,7 $\pm$ 0,9	8,4 $\pm$ 2,6	38,6 $\pm$ 3,5
		30	9,0 $\pm$ 1,0	8,5 $\pm$ 2,1	35,9 $\pm$ 4,2
NaCl	3 M	40	56,6 $\pm$ 3,2	50,8 $\pm$ 5,2	225,3 $\pm$ 12,6
	3 M	60	36,7 $\pm$ 3,6	36,5 $\pm$ 6,6	146,2 $\pm$ 14,4

\*medida de intensidad de banda por densitometría utilizando el software ImageJ de la muestra purificada respecto de la medida para el extracto crudo en relación a sus volúmenes.

\*\*medida de fluorescencia de la fracción purificada respecto de la medida para el extracto crudo en relación a sus volúmenes.

\*\*\*cuantificación de proteínas por BCA de la fracción purificada.

En pos de buscar una condición de purificación que permita recuperar una mayor proporción de RFP-ELP, se evaluaron los rendimientos obtenidos para una única ronda de purificación en comparación con los obtenidos con dos rondas. Para ello, se estudiaron por los métodos ya mencionados los rendimientos alcanzados en cada etapa, y en base a las medidas de fluorescencia se calcularon los parámetros que se detallan a continuación (Tabla 3). En primer lugar se calculó la actividad de fluorescencia total de la muestra en unidades arbitrarias. Se definió actividad específica como actividad de fluorescencia total respecto de la cantidad de proteínas totales y el factor de purificación como actividad específica de la etapa respecto de la actividad específica del extracto crudo. El porcentaje de pureza se calculó por densitometría de la tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250 como intensidad de la banda de RFP-ELP respecto de la intensidad total. Los resultados muestran que en una única ronda de purificación se obtiene un rendimiento del 77,4% y que la actividad específica se ve incrementada de 0,2 del extracto crudo a 23 para esta ronda. El factor de purificación para esta etapa fue de 133,6. En una segunda ronda de purificación se obtiene un rendimiento de 50,8% respecto de la fluorescencia inicial con una actividad específica de 25,9. Este paso produce un factor de purificación de 150,4 respecto de la muestra inicial. Se puede observar en la tabla que la pureza alcanzada por la primera etapa es un 14% inferior a la obtenida en la segunda, pero la actividad específica aumentó un 11%. Estos resultados se traducen en que con una ronda de purificación se obtiene una mayor cantidad de RFP-ELP con un 14% de impurezas y con una segunda etapa se obtiene un producto de mayor pureza, con mayor actividad específica, pero con menor cantidad de RFP-ELP.

Se concluye de esta sección que la molécula reportera RFP-ELP sufre la agregación inducida por el cambio de temperatura y por ello, es posible purificarlo por ITC. Se mostró también que la mejor condición para purificarla por este método fue utilizando NaCl en una concentración 3 M, fijando 40 °C como temperatura para inducir la agregación. Además, se determinó que ambas técnicas de determinación del rendimiento son válidas ya que producen resultados comparables. Por último, se mostró que dos rondas de purificación producen una muestra de alta pureza de RFP-ELP, sin embargo se puede incrementar el rendimiento utilizando una única ronda de purificación. Se

genera entonces una situación de compromiso entre adquirir una mayor pureza o una mayor concentración de la proteína de interés, que se resolverá según la calidad requerida en cada caso.

**Tabla 3. Tabla de purificación de RFP-ELP para las diferentes rondas de ITC**

Etapa de purificación	Rendimiento		Actividad de Fluorescencia Total (UA)	Actividad Específica*** (UA/mg de proteínas)	Factor de Purificación	% Pureza
	% por Fluorescencia*	µg RFP-ELP/g de hoja fresca**				
Extracto Crudo	100	443 ± 21,3	11,5	0,2	1	0,7
Ronda 1	77,4 ± 4,9	343 ± 15,3	7,9	23,0	133,6	86,7
Ronda 2	50,8 ± 5,2	225,3 ± 12,6	5,8	25,9	150,4	99,6

\*medida de fluorescencia de la fracción purificada respecto de la medida para el extracto crudo en relación a sus volúmenes.

\*\*cuantificación de proteínas de la fracción purificada por BCA. Para el extracto crudo se calcula la cantidad de RFP-ELP en base a la cantidad medida en la purificación y el rendimiento calculado.

Actividad específica: Unidades Arbitrarias (UA) de fluorescencia respecto de la cantidad de proteínas totales.

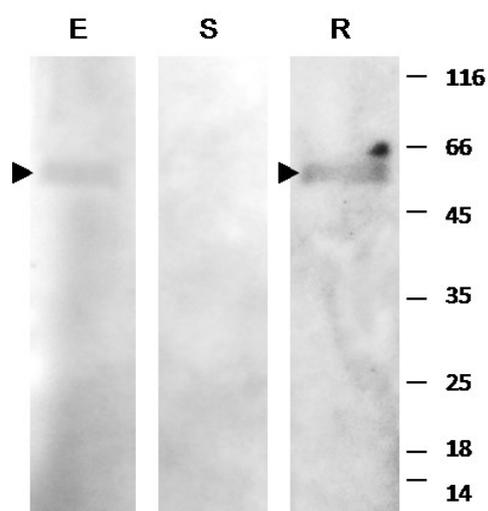
Factor de purificación: Actividad específica de la muestra respecto de la actividad específica inicial.

% Pureza: Se calculó el porcentaje de pureza por densitometría de la tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250 como intensidad de la banda de RFP-ELP respecto de la intensidad total.

### 4.3 Purificación de scFv-ELP por ITC

Para desarrollar el método de purificación de TG2 era necesario en primer lugar obtener la molécula de captura scFv-ELP purificada. Para ello se decidió hacerlo por ITC utilizando la condición que mejor resultados dio para RFP-ELP. Se partió de hojas infiltradas con agrobacterias llevando la construcción codificante para scFv-ELP con una  $DO_{600}$  0,4 y las muestras fueron cosechadas de 5 plantas diferentes a los 5 dpi, realizando este experimento por triplicado. El extracto crudo fue purificado por dos rondas de ITC con NaCl 3 M a 40 °C de manera de obtener una muestra de alta pureza. Las fracciones obtenidas en la purificación fueron analizadas por inmunoblot empleando un anticuerpo específico del *tag* de histidinas. Como se muestra en la Figura 20, se detectaron bandas del tamaño esperado para scFv-ELP en las calles correspondientes al extracto crudo (E) y la fracción purificada (R). No se detectó scFv-ELP remanente en el sobrenadante de la primera ronda de ITC

(S). Estos resultados indican que scFv-ELP logró ser purificada por ITC utilizando NaCl 3 M y una Ta de 40 °C, y que se detecta íntegra después de todo el proceso.



**Figura 20. Inmunoblot del ensayo de purificación de scFv-ELP por ITC.**

En la calle E se sembró el extracto crudo de hojas expresando scFv-ELP, en la calle S el sobrenadante de la primera centrifugación a temperatura ambiente del ITC y en la calle R el sobrenadante de la centrifugación en frío de la segunda ronda de purificación. Se detectaron bandas que se marcan con puntas de flecha en las calles E y R del tamaño detectado previamente para scFv-ELP (58 kDa). El patrón de peso molecular se expresa en kDa.

Los rendimientos del proceso de purificación para scFv-ELP se determinaron por cuantificación de la intensidad de banda de los inmunoblots (Tabla 4). Los resultados muestran que el rendimiento porcentual obtenido para 2 rondas de ITC fue en promedio de 19,1%. Se evaluó además el rendimiento de la purificación por ITC para la coagregación con RFP-ELP. Para ello se adicionó una cantidad de RFP-ELP purificado que permita llegar a la concentración de los extractos utilizados en la sección 4.2 (450 µg RFP-ELP/g de hoja fresca). El rendimiento porcentual obtenido en esta condición fue en promedio del 83%, representando un incremento de 4,4 veces respecto del caso anterior. A partir de los rendimientos porcentuales, y conociendo la cantidad de proteína pura obtenida por cada gramo de hoja, se estimó que los niveles de expresión alcanzados por scFv-ELP en las condiciones descritas fue de  $79,2 \pm 4,2$  µg scFv-ELP/g de hoja fresca aproximadamente, similar a los resultados obtenidos previamente por ELISA. Se muestran además en la Tabla 5 algunos ejemplos de los rendimientos obtenidos en la producción de proteínas recombinantes fusionadas a ELP cortos y purificadas por ITC. Como se puede apreciar en la tabla, los rendimientos reportados para casos de ELP cortos son muy variados y los obtenidos en este trabajo se encuentran dentro del rango de resultados alcanzados por otros grupos.

Esta parte del trabajo demuestra que scFv-ELP puede ser purificado por ITC en las mismas condiciones que RFP-ELP aunque se exprese en menor nivel. Además, se demostró que el agregado de RFP-ELP purificado permite incrementar el rendimiento de la purificación por ITC de scFv-ELP en 4,4 veces.

**Tabla 4. Rendimiento de la purificación de scFv-ELP**

Etapa de purificación	% TSP	µg /g de hoja fresca*	Rendimiento porcentual**
Extracto Crudo	0,12	79,2 ± 4,2	100
2 rondas ITC	0,02	15,2 ± 3,4	19,1 ± 3
2 rondas ITC coprecipitado	0,08	66,7 ± 7,2	83,0 ± 5,7

\*cuantificación de proteínas de la fracción purificada por BCA. Para el extracto crudo y la purificación por coprecipitación se calcula la cantidad de scFv-ELP en base a la cantidad de proteína purificada y el rendimiento medido.

\*\* en base a la medida de intensidad de banda por densitometría del inmunoblot utilizando el software ImageJ de la muestra purificada respecto de la medida para el extracto crudo en relación a sus volúmenes.

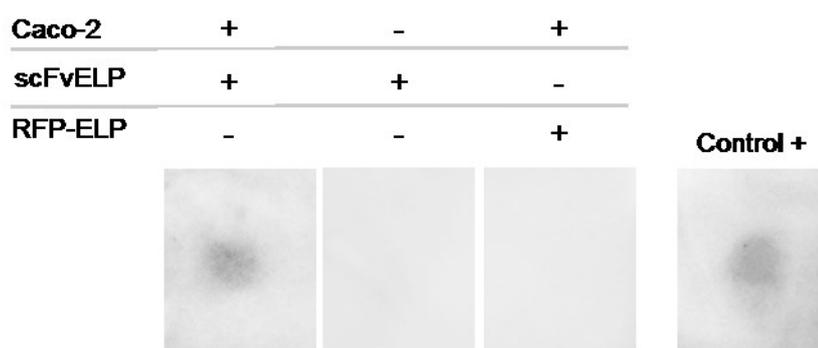
**Tabla 5. Rendimientos de proteínas purificadas por ITC utilizando ELP cortos.**

Proteína	Repeticiones de ELP	Sistema de expresión	Cantidad de proteína obtenida	Rendimiento porcentual	Referencia
scFv-ELP	30	<i>N. tabacum</i> , expresión transitoria	0,9 % TSP	33	(Conley y col. 2009)
scFv-ELP	28	<i>N. tabacum</i> , expresión transitoria	2,3 µg/g hoja fresca	30	(Joensuu y col. 2009)
RSL-ELP	40	<i>E. coli</i>	17 mg/L	95	(Arnold y Chen 2014)
cecropin-AD-ELP	36	<i>E. coli</i>	79,3 mg/L	No informa	(Yang y col. 2012)
ELP	20	<i>E. coli</i>	32.7 ± 13.5 mg/L	No informa	(Bataille y col. 2016)
	40	<i>E. coli</i>	35.3 ± 16.7 mg/L	No informa	
	60	<i>E. coli</i>	33.6 ± 12.8 mg/L	No informa	
scFv-ELP	36	<i>N. benthamiana</i> , expresión transitoria	15,4 ± 4,3 µg/g hoja fresca	19	El presente trabajo
scFv-ELP coprecipitado	36	<i>N. benthamiana</i> , expresión transitoria	66,7 ± 7,2 µg/g hoja fresca	83	
RFP-ELP	36	<i>N. benthamiana</i> , expresión transitoria	225,3 ± 12,6 µg/g hoja fresca	51	

## 5. Funcionalidad de scFv-ELP como molécula de captura de TG2

### 5.1 Estudio de la capacidad de scFv-ELP para reconocer TG2

Una vez obtenido el scFv-ELP purificado, nos interesó evaluar su funcionalidad como anticuerpo específico de TG2. Para ello, se planteó como primer paso un ensayo dot-blot donde la membrana fuera sensibilizada con TG2 proveniente de células Caco-2 empleando el scFv-ELP como anticuerpo. En este ensayo se utilizaron dos controles negativos para asegurar su especificidad: por un lado ausencia del antígeno TG2 y por otro se evaluó el reconocimiento directo de los anticuerpos secundarios y esteptavidina a TG2 o ELP. Como control positivo se empleó el mAb 2G3 proveniente de ascitis de ratón. El resultado de este ensayo se presenta en la Figura 21, donde se aprecia que los controles negativos y positivos dieron de acuerdo a lo esperado, demostrando que el ensayo es específico y además se confirma que el scFv-ELP purificado de plantas reconoce TG2 de Caco-2. En conjunto con los resultados de la sección anterior, podemos afirmar que la fusión scFv-ELP puede producirse en plantas y purificarse por ITC sin afectar su funcionalidad.



**Figura 21. Reconocimiento de TG2 por scFv-ELP**

Ensayo Dot-Blot donde las membranas fueron tratadas según se indica; sensibilizadas con extracto de células Caco-2 y se estudió el reconocimiento por scFv-ELP purificado, RFP-ELP purificado como control negativo y el anticuerpo monoclonal 2G3 de ratón específico de TG2 como control positivo. Como control de especificidad se incubó una membrana sin sensibilizar con el scFv-ELP purificado. Las membranas incubadas con scFv-ELP y RFP-ELP a continuación se trataron con anti-Histidinas de ratón. Luego todas las muestras se incubaron con anti-ratón conjugado con biotina y a continuación con estreptavidina conjugada a HRP. Se revelaron los inmunoblot por quimioluminiscencia. Se detectó señal tanto para la membrana incubada con scFv-ELP purificado como para el control positivo, mientras que las otras muestras no mostraron señal.

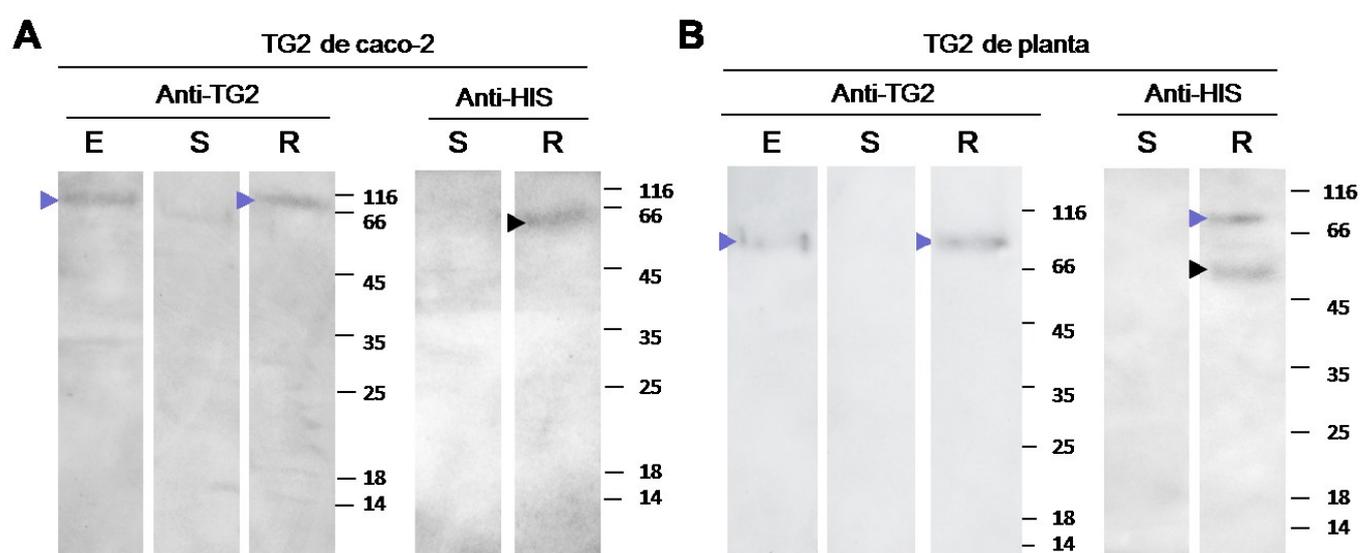
## 5.2 Inmuncaptura de TG2 con el scFv-ELP

Con el fin de evaluar la molécula producida como reactivo de inmuncaptura se diseñaron experimentos para evaluar la capacidad de scFv-ELP para recuperar TG2 por ITC proveniente de dos posibles fuentes: extracto de células Caco-2 y extracto de hojas expresando transitoriamente ER-TG2. En ambos casos se buscó modelar una situación real que permita purificar TG2 en un solo paso de purificación a partir de los extractos crudos. En el caso de TG2 de células Caco-2, las células se lisaron con agua destilada y para ER-TG2 producida en plantas se realizó la extracción de proteínas solubles. En ambos casos se adicionó NaCl para ajustar su concentración a 3 M que es la condición que se ajustó para la purificación por ITC. A estos extractos se le agregó el scFv-ELP purificado y se incubó a temperatura ambiente para que ocurra interacción entre TG2 y scFv-ELP. Posteriormente se desarrolló la purificación por ITC tal como se describió previamente. Las diferentes fracciones se analizaron por inmunoblot revelando con el mAb 2G3 para detectar TG2 y con el anti-HIS para evaluar la presencia del scFv-ELP como se presenta en la Figura 22. Para los dos experimentos se detecta la banda de TG2 en las primeras calles (E) que representan los extractos iniciales sin scFv-ELP. En las calles correspondientes a la fracción soluble luego de la centrifugación a temperatura ambiente de la ITC (S) no se detectó TG2 ni scFv-ELP, mientras que en la fracción soluble de la resolubilización luego de la ITC (R) se encontraron bandas de los tamaños esperados para ambas proteínas en los dos experimentos. Para el caso de scFv-ELP se reveló una banda de mayor tamaño a la que se encontró en las secciones anteriores utilizando condiciones reductoras, probablemente debido a la presencia de un enlace disulfuro que une las cadenas liviana y pesada del anticuerpo.

La eficiencia de recuperación de TG2 se midió por densitometría del inmunoblot obteniendo un rendimiento del 80,2% para el experimento con extracto de células Caco-2 y un 56,7% para el experimento realizado con extracto de hojas. Para este último caso el rendimiento en cantidad de ER-TG2 corresponde aproximadamente a 30,9  $\mu\text{g/g}$  de hoja fresca. Estos resultados

demuestran que tanto la TG2 de células Caco-2 como la versión reticular producida en plantas son reconocidas por scFv-ELP también producido en planta y que la interacción es lo suficientemente fuerte como para permitir su purificación por ITC.

Los resultados de esta sección muestran que la molécula de captura scFv-ELP fue funcional para unir ambas versiones de TG2 de manera que puedan ser copurificadas por ITC. Esta molécula se mantuvo estable durante el proceso de purificación al igual que TG2, hecho que apoya su potencial para purificar TG2.



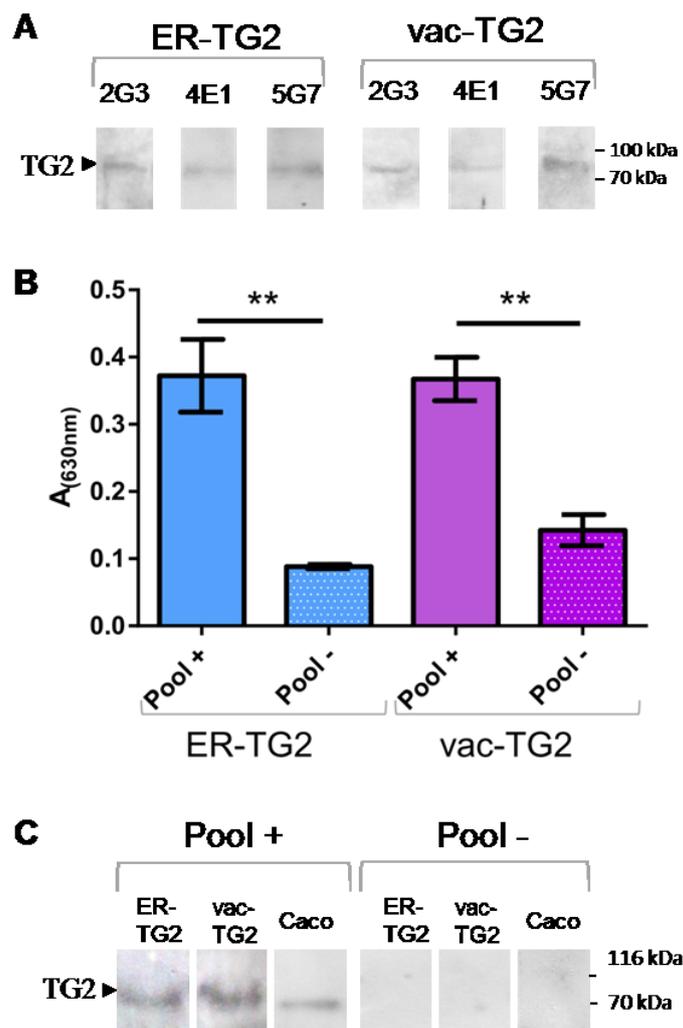
**Figura 22. Inmunocaptura de TG2 por scFv-ELP**

Los paneles A y B muestran los inmunoblot revelados contra TG2 o tag de histidinas de los ensayos de recuperación de TG2. El panel A representa el experimento donde se utilizó células Caco-2 como fuente de TG2 mientras que en el panel B se muestra el experimento donde se utilizó TG2 producida en planta. En la calle E se sembraron los extractos de células Caco-2 o de hoja expresando ER-TG2, S contiene el sobrenadante de la precipitación selectiva que representa la fracción no recuperada de TG2 y R contiene la fracción resolubilizada luego de la precipitación que representa la fracción recuperada de TG2. Las bandas correspondientes a TG2 se señalaron con puntas de flechas azules, mientras que las bandas de scFv-ELP se señalaron con una punta de flecha negra. El patrón de peso molecular se expresa en kDa.

## 6. Utilidad de TG2 producida en plantas como antígeno para el diagnóstico de la enfermedad celíaca

Una vez optimizadas las condiciones de expresión de TG2 y habiendo desarrollado el nuevo sistema de purificación, se procedió a evaluar la

funcionalidad de TG2 como antígeno para el diagnóstico de EC utilizando sueros de pacientes. Para estos ensayos se seleccionaron las versiones ER-TG2 y vac-TG2 ya que fueron las que mejor expresión tuvieron. En primer lugar se evaluó su utilidad como antígeno frente a los tres mAb específicos de TG2 disponibles: 2G3, 4E1 y 5G7, que reconocen diferentes epitopes de la proteína. Para ello se purificaron las versiones de TG2 de interés y se revelaron por inmunoblot utilizando los mAb mencionados. Como se muestra en la Figura 23.A, tanto para ER-TG2 como para vac-TG2 se revelaron bandas del tamaño esperado frente a los tres mAb. Este resultado indica que aunque en humanos TG2 se encuentra localizada en el citosol, la introducción en la vía secretoria de la planta no afecta la estructura de los epitopes reconocidos por estos mAbs. Con el fin de probar la efectividad de las versiones ER-TG2 y vac-TG2 purificado de planta en un test de detección para EC, se realizó un ELISA utilizando un pool de 12 sueros de pacientes con EC y donantes sanos como control (Figura 23.B). Los sueros de pacientes con EC fueron caracterizados previamente de manera de asegurar que contengan IgA, que es característica de mucosas. Se encontró que la mezcla de sueros de EC reconoció ambas versiones ER-TG2 y vac-TG2 con una diferencia significativa con respecto al valor obtenido para los controles sanos. También se ensayó por inmunoblot el reconocimiento de TG2 purificado de planta por los sueros (Figura 23. C). Este ensayo confirmó que las variantes ER-TG2 y vac-TG2 de tamaño completo fueron reconocidos por los sueros de pacientes con EC, mientras que no fueron detectadas por sueros de personas sanas utilizados como control. Por lo tanto, podemos concluir que las versiones ER-TG2 y vac-TG2 producidas en planta conservaron los epitopes reconocidos por las IgA de los sueros de individuos celíacos. Estos resultados señalan la utilidad de la TG2 producida en plantas para desarrollar pruebas de detección de EC.



**Figura 23. ER-TG2 y vac-TG2 purificado de planta como antígeno para diagnóstico de EC.**

En el panel A se muestran los inmunoblot de ER-TG2 y vac-TG2 por los anticuerpos monoclonales 2G3, 4E1 y 5G7. El panel B muestra un ELISA donde se sensibilizó con la proteína purificada, se bloqueó e incubó toda la noche a 4 °C con los sueros de pacientes celíacos o de personas sanas. Luego se incubó con un anticuerpo específico de IgA humana conjugado con HRP y se reveló con el reactivo TMB, se midió absorbancia a 630 nm. \*\*Muestra una diferencia estadísticamente significativa por el test de comparaciones múltiples de Tukey's ( $p < 0.01$ ). En el panel C se muestra un inmunoblot donde se revelaron las bandas de ambas versiones de TG2 con un pool de sueros de pacientes con EC. Se utilizó como control un extracto de células Caco-2. Como control negativo se incubó con un pool de sueros de personas sanas que no reveló ninguna banda.

*Discusión*

Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar una estrategia para producir TG2 humana en plantas de forma de disponer de una tecnología que permita obtener esta molécula a costos accesibles que en un futuro permitan la implementación de métodos de *screening* masivos de enfermedad celíaca. TG2 es una proteína desafiante para los distintos sistemas de expresión disponibles, pues interfiere con el metabolismo normal de la célula y sufre autoproteólisis. Por eso se planteó el desarrollo de una estrategia de producción empleando métodos de expresión temporal en hojas de *Nicotiana benthamiana* y se estudiaron diferentes factores, que no habían sido explorados, que afectan tanto la síntesis y estabilidad de la proteína como su recuperación, describiéndose a continuación los principales hallazgos de este trabajo.

Teniendo en cuenta que los rendimientos obtenidos al expresar una molécula foránea varían considerablemente entre los distintos compartimientos celulares que posee una célula eucariota, una de las variables analizadas fue el direccionamiento a diferentes compartimientos. Se demostró que las versiones de retículo endoplásmico y vacuolar de TG2 se obtienen en niveles significativamente más altos que las versiones citosólica y de apoplasto. En hojas, el ER es un destino favorable para muchas proteínas, tales como la vicilina (Wandelt y col. 1992), anticuerpos simple cadena (Schouten y col. 1996, Fiedler y col. 1997) y de longitud completa (Petruccelli y col. 2006, Ocampo y col. 2016), la versión truncada de la hemaglutinina de la gripe (Mortimer y col. 2012), complemento humano C5a (Nausch y col. 2012). Esta estrategia de direccionamiento subcelular por fusión a señales KDEL/HDEL se utiliza con frecuencia, sin embargo no siempre mejora la acumulación de la proteína recombinante (Boothe y col. 2010, Hood y col. 2012). A diferencia de la retención en el RE, el direccionamiento de proteínas foráneas hacia la vacuola central de la hoja ha sido menos estudiado como estrategia de direccionamiento. La vacuola central de las células vegetales es una de los más grandes compartimientos subcelulares que almacenan iones y metabolitos (Marty 1999). Aunque se considera un ambiente hostil para la acumulación de proteínas heterólogas (Hood y col. 2012), algunas proteínas se acumulan en altos niveles en vacuolas centrales tales como la glucocerebrosidasa en células de zanahoria (Shaaltiel y col. 2007), IgG en células BY2 de tabaco (Misaki y col. 2011) y en hojas de *Nicotiana benthamiana* (Ocampo y col. 2016), alfa-

manosidasa humana en hojas de tabaco (De Marchis y col. 2013), factor de complemento humano C5a en hojas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* (Nausch y col. 2012), colágeno humano en hojas de tabaco (Stein y col. 2009), cellobiohidrolasas fúngicas y endoglucanasas bacterianas en hojas de caña de azúcar (Harrison y col. 2011, Harrison y col. 2014). Otras proteínas, tales como Ig G1 y G4 humana se obtienen con mayores rendimientos en suspensiones celulares de zanahoria si se emplean versiones secretorias en comparación con las variantes de ER y vacuolares (Shaaltiel 2006). También la versión de ER de la proteína de seda de araña expresada en hojas de *Arabidopsis thaliana* se produce en mayores niveles que la versión vacuolar (Yang y col. 2005). Estos ejemplos demuestran la potencialidad que tienen las vacuolas de tejidos vegetativos para acumular proteínas foráneas que, sumados a los numerosos casos informados de acumulación estable de proteínas heterólogas en vacuolas de almacenamiento de tejidos reproductivos (Stoger y col. 2005, Khan y col. 2012), sugieren que el direccionamiento vacuolar es una alternativa con mucho potencial. Es de destacar que dependiendo de la naturaleza de la proteína el direccionamiento vacuolar puede tener un desempeño igual, inferior o superior a la retención en el ER (Pérez Aguirreburualde y col. 2016). En el caso particular de TG2 los rendimientos obtenidos para ER-TG2 y vac-TG2 son comparables como se demostró en este trabajo, por lo que cualquiera de estas dos variantes resulta de utilidad para el desarrollo de un método de producción.

Para que el sistema de producción de una proteína foránea sea factible no solo es importante alcanzar rendimientos adecuados en la síntesis sino que es necesario contar con una estrategia de purificación eficiente. Por este motivo se planteó generar una molécula de captura que uniera TG2 específicamente, que pueda ser separada de otras proteínas, que pudiera ser sintetizada fácilmente y, fundamentalmente, que pudiera funcionar aunque TG2 se expresara en bajos niveles. Con esta finalidad se diseñaron y generaron las moléculas de captura scFv-ELP y (scFv)<sub>3</sub>-ELP. La capacidad del scFv 2G3 de reconocer TG2 había sido demostrada expresándolo en bacterias (Scabone 2012), y en este trabajo se planteó fusionarlo al tag ELP(V8F)<sub>36</sub> que es más hidrofóbico que otros ELP expresados en plantas (Conley y col. 2009, Floss y col. 2010). Las moléculas de captura fueron clonadas en el vector pEAQ-DEST1 dando origen a pEAQ-scFv-ELP y pEAQ-(scFv)<sub>3</sub>-ELP, además de una

construcción control sin el scFv: pEAQ-ELP. Para facilitar el ajuste de las condiciones de expresión transitoria también se generaron las construcciones reporteras pEAQ-RFP-ELP y pEAQ-RFP-scFv. Estas construcciones fueron de suma utilidad para ajustar las condiciones de expresión, de precipitación por transición inversa como se presentó en las secciones 2 y 4 de resultados, como así también evaluar la formación de cuerpos proteicos en el ER presentados en la sección 3. En las secciones 5 y 6 se evaluó la funcionalidad de la molécula de captura y de TG2 como antígeno para diagnóstico. Los principales hallazgos de estas secciones se discuten a continuación.

En la segunda sección de resultados, se mostró que las moléculas scFv-ELP, RFP-ELP y ELP se pueden producir por expresión temporal en *N. benthamiana*. Dado que en la bibliografía no hay un criterio unificado sobre las condiciones de expresión que funcionen óptimamente para todas las clases de proteínas producidas por expresión transitoria (Tabla I.3), fue necesario ajustar ciertos factores de manera de obtener buenos niveles de acumulación. Para todos los casos se estudiaron las cinéticas de expresión, obteniendo que los máximos niveles de acumulación se encontraban entre los 5 y 7 dpi. Este resultado es similar a los datos de la Tabla I.3, donde se muestra que en muchos casos el máximo nivel de acumulación se encuentra a los 6 dpi. También se buscó optimizar la  $DO_{600}$ , ya que se utiliza un rango que va de 0,002 a 1 para diferentes casos (Tabla I.3) y no hay una relación clara entre  $DO_{600}$  utilizada y rendimiento de producción. No logramos optimizar la  $DO_{600}$  de agrobacterias a utilizar, ya que las diferencias en la acumulación no fueron estadísticamente significativas entre las condiciones ensayadas, por lo cual una vez que se encontró una condición adecuada se mantuvo para los siguientes experimentos tanto en la sección 1 como en la 2. Los rendimientos obtenidos para scFv-ELP, RFP-ELP y ELP fueron de  $80 \pm 12$ ,  $450 \pm 23$  y  $84 \pm 15$   $\mu\text{g/g}$  hoja fresca respectivamente, mientras que el (scFv)<sub>3</sub>-ELP no pudo ser detectado. Aunque las construcciones pEAQ-scFv-ELP, pEAQ-RFP-ELP y pEAQ-ELP poseen los mismos elementos regulatorios: promotor, 5' y 3' UTR, secuencias codificantes para el péptido señal secretorio, tag de seis histidinas y SEKDEL, sorprende que RFP-ELP tenga rendimientos 5,3 y 6 veces superiores a scFv-ELP y ELP, respectivamente. Estas diferencias podrían deberse a que la traducción del mRNA RFP-ELP es más eficiente o bien a una mayor

estabilidad de este mRNA o de la proteína RFP-ELP. Sabido es que los rendimientos dependen de varios factores tales como el uso de codones en la secuencia codificante que afecta la transcripción, estabilidad y traducción del mRNA como así también de las características intrínsecas de la proteína de interés que determinan su estabilidad y su incidencia en procesos metabólicos que ocurren en la célula huésped (Egelkroust y col. 2012, Ullrich y col. 2015, Pérez Aguirreburualde y col. 2016). Que el scFv-ELP tenga menores rendimientos que RFP-ELP podría deberse a que el scFv es menos estable por la presencia de lazos (*loops*) en la estructura, un plegado menos eficiente por la presencia de uniones disulfuro o a que el uso de codones no se optimizó para plantas. Sin embargo, algo menos esperado es que ELP también se acumule en cantidades menores que RFP-ELP, ya que esta secuencia ha sido optimizada para plantas, es más pequeña por lo que la traducción debería ser eficiente y en la mayor parte de los trabajos se muestra que el *tag* ELP estabiliza a las proteínas fusionadas (Conley y col. 2009, Floss y col. 2010). Aunque no tenemos una explicación para la diferencia en los rendimientos entre RFP-ELP y ELP, el hecho que RFP-ELP sea más fácil de sintetizar podría ser explotado para otros fines. Los resultados de la sección 5 muestran que el agregado de RFP-ELP logró incrementar el rendimiento de la purificación de scFv-ELP por ITC, y extrapolando este resultado a la captura de TG2 en bajas concentraciones se podría utilizar RFP-ELP como molécula facilitadora del colapso de los complejos antígeno-anticuerpo formados por TG2 y scFv-ELP.

Otro resultado novedoso de la tesis es la comparación de vectores de expresión en plantas. En este trabajo, comparamos la expresión de las construcciones RFP-ELP y RFP-scFv en pGWB2 y pEAQ-DEST1. Para poder hacerlo fue necesario poner a punto un diseño experimental que permitiera reducir las variaciones en los rendimientos que ocurren entre hojas de una misma planta, entre plantas de igual o diferentes lotes, además de las variaciones que son producto de los diferentes rendimientos de extracción y determinación de las proteínas de interés y totales. Los resultados mostraron que los rendimientos obtenidos para estos genes reporteros en pEAQ son entre 8,1 y 9,5 veces superiores a los obtenidos en pGWB2 en ausencia de TBSV-p19, pero son sólo 1,8 veces superiores si se coinfiltra las agrobacterias que llevan las construcciones en pGBW2 con agrobacterias que tengan el TBSV-

p19. En el caso de las construcciones de TG2 no se encontraron diferencias significativas entre los rendimientos obtenidos para las expresiones de pBLTi-ER-TG2 y pGWB2-vac-TG2 todas en presencia de TBSV-p19. Sin embargo, la expresión de pGWB2-RFP-TG2 produjo niveles de expresión superiores a los obtenidos para las otras versiones de TG2 (26 µg/g hoja fresca), similar a los resultados descritos para RFP-ELP. Tomados en conjunto, nuestros resultados muestran que la coexpresión con TBSV-p19 introduce una mejora significativa en los niveles de acumulación de la proteína de interés cuando se utiliza el vector binario pGWB2, pero que el uso de pEAQ-DEST1 produce una mejora respecto del caso anterior para los casos evaluados.

En la tercera sección de resultados se evaluó la capacidad del ELP(V8F)<sup>36</sup> de inducir la formación de PB en el ER a fin de evaluar la hipótesis de que estas estructuras generarían un ambiente donde la proteína foránea permanecería estable y que los incrementos en los niveles de acumulación ocurrirían aún sin que el *tag* ELP esté unido covalentemente a la misma (efecto en “*trans*”). Por microscopía confocal se corroboró que RFP-ELP forma PB en el ER y además se mostró que proteínas no fusionadas al ELP como GFP-HDEL colocalizan en los PB. Se demostró que el efecto en *trans* ocurre, ya que GFP-HDEL se acumula en niveles más altos (2.0 veces) en presencia de ELP que en su ausencia. Las moléculas scFv-ELP y ELP también formaron PB que se pudieron visualizar mediante la presencia de GFP-HDEL. Para TG2 también se detectó el efecto en *trans*, ya que los rendimientos de ER-TG2 y vac-TG2 fueron más altos (2,1 y 2,5 veces, respectivamente) en presencia de ELP. En cambio, los niveles de acumulación de sec-RFP, que es mayoritariamente secretada, no fueron mejorados por la presencia del ELP. Se observó también que la inducción de PB por scFv-ELP produjo un incremento en los niveles obtenidos de ER-TG2 de 5,7 veces, que resulta casi el triple que el aumento detectado por coexpresión con ELP. De nuestros resultados se desprende que, aunque ELP es capaz de mejorar la acumulación de proteínas retenidas en la vía secretoria, el incremento es mayor si ocurre una interacción del ELP con la proteína de interés, como se concluye del último resultado. El efecto en *trans* de los ELP ha sido recientemente informado para las versiones secretorias de eritropoyetina humana y interleuquina-10 coinfiltrada con las construcciones GFP-ELP y GFP-hidrofobina I (Saberianfar y col. 2015). Sin embargo en esta

tesis no se observaron diferencias en los niveles de sec-RFP con o sin ELP. Tomados en conjunto, nuestros resultados indican que el efecto de ELP en la acumulación de proteína es dependiente de la naturaleza proteica y de su destino final en la célula. La combinación de estrategias de direccionamiento subcelular y la inducción de PB por coexpresión de ELP y scFv-ELP fueron suficientes para aumentar los niveles de acumulación de TG2 en ensayos de expresión transitoria, para permitir la posterior purificación de ambas vac-TG2 y ER-TG2.

En la sección 4 se evaluó si ELP(V8F)<sub>36</sub> podía ser purificado por ciclos de transición térmica. La proteína RFP-ELP fue exitosamente purificada por ITC, y se mantuvo estable durante el proceso de purificación. La condición que produjo el mayor rendimiento de la proteína reportera, fue la inducción de la agregación a 40 °C en presencia de NaCl 3 M, seguido de centrifugación y resuspensión de los agregados en agua desionizada a 4 °C. Estos resultados son similares a los informados por Conley y col. (2009) para una molécula similar. Se corroboró también que a mayor temperatura no se producen mejoras en el rendimiento. El reemplazo de NaCl por (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tampoco logró introducir una mejora en los rendimientos, a diferencia de los resultados obtenidos por otros grupos (Fong y col. 2009, Duvenage y col. 2013, Liu y col. 2014). Utilizando las condiciones de purificación de RFP-ELP, se logró purificar scFv-ELP exitosamente. Los rendimientos alcanzados con este sistema fueron de 225,3 ± 12,6 µg de RFP-ELP/g de hoja fresca para y 15,4 ± 4,3 µg de scFv-ELP/g de hoja fresca, con alto grado de pureza. Alternativamente pueden purificarse en una única ronda de ITC obteniendo mayores rendimientos pero con menor pureza. De esta manera, el sistema puede ajustarse a las necesidades de rendimientos y grado de pureza requeridos según la aplicación que tendrá la proteína recombinante. Si se prioriza la pureza se utilizarán dos o más rondas de purificación, y en el caso que se requiera alto rendimiento con bajo requerimiento en pureza puede utilizarse una única ronda de purificación. Nuestros resultados fueron comparables con los obtenidos por otros investigadores que muestran una gran variedad de rendimientos según la proteína expresada, como se muestra en la Tabla 5 de la sección de resultados. Por último, se corroboró que el rendimiento de la purificación de scFv-ELP por ITC se encontraba limitado por la baja concentración de ELP, ya

que el incremento de la misma por adición de RFP-ELP logró aumentar aproximadamente 4,4 veces la eficiencia del proceso. Este resultado muestra que, tal como se describe en algunos trabajos (Ge y Filipe 2006, Floss y col. 2010), para los casos en los que los niveles de expresión no son tan elevados, como el caso de scFv-ELP, la adición de ELP exógeno logra incrementar significativamente el rendimiento de la purificación. Este concepto constituye un método eficiente, específico y totalmente reversible para aplicar en la purificación por ITC de proteínas recombinantes fusionadas a ELP.

En la quinta sección se demostró que la molécula scFv-ELP producida en *N. benthamiana* fue capaz de purificar TG2 de células Caco-2 y plantas con rendimientos del 80,2% y 56,7% respectivamente. Las diferencias en la eficiencia se deben a las bajas concentraciones de TG2 en plantas, sin embargo es de destacar que funcionó cuando algunos rellenos cromatográficos disponibles comercialmente para purificar por afinidad por unión a níquel, no lo hicieron. Este resultado es muy importante, pues existe una gran necesidad de métodos eficaces, simples y económicos de purificación de proteínas como es la precipitación selectiva comparada con una cromatografía de afinidad. El reactivo generado es estable, lo que elimina los problemas que genera el desprendimiento de anticuerpos inmovilizados en columnas de afinidad. Aunque para producir una molécula como ésta es necesario acceder a los genes codificantes para el anticuerpo, en la actualidad varias empresas ofrecen el servicio de clonado molecular y secuenciación de anticuerpos a partir de hibridomas. Esto facilitaría el diseño de moléculas que se adapten a distintos antígenos. Otro hecho que destaca este resultado es que para productos farmacéuticos los organismos regulatorios cuestionan la presencia de *tags* por su potencial inmunogenicidad (Fischer y col. 2012). También se cuestiona que la estructura de la proteína de interés, puede verse modificada por la fusión a un *tag* incluso removiéndolos en un paso posterior (Li 2011). Por otro lado, el mayor costo en la producción de una proteína recombinante se encuentra en el proceso *downstream*, es por ello que resulta un factor clave a mejorar para que las plataformas de producción de proteínas en plantas sean más competitivas (Lojewska y col. 2016). Teniendo en cuenta estos dos aspectos, la ventaja de no utilizar *tag* de fusión para producir la proteína de interés y la necesidad de disminuir los costos de purificación, resulta de interés generar nuevas

estrategias que permitan el aprovechamiento de las nuevas tecnologías, sin afectar las características de la proteína recombinante. Es por ello que en este trabajo desarrollamos un sistema alternativo de purificación de proteínas sin fusionar a un *tag* y sin afectar la estructura ni propiedades de la proteína de interés. Nuestros resultados mostraron que la molécula de captura scFv-ELP no solo fue capaz de reconocer su molécula antígeno, sino que además logró capturarla en solución sin ninguna etapa previa de purificación o concentración, para luego copurificarla por ITC. Esta molécula que presenta bajos costos de producción permitió desarrollar un sistema de purificación que resulta más específico y económico que una cromatografía de afinidad. Otros trabajos han logrado producir en plantas anticuerpos simple cadena fusionados a ELP en buenos niveles de producción (Conley y col. 2009) y en algún caso se ha demostrado su funcionalidad para unir antígeno (Joensuu y col. 2009). Sin embargo, no hay trabajos que muestren su aplicación para desarrollar un sistema de purificación que funciona bien empleando sistemas de expresión temporal y que se puede aplicar a la purificación de antígenos sin fusionar a *tag* aunque se expresen en muy bajos niveles, como es el caso de TG2.

En la sexta sección de resultados se evaluó la utilidad de TG2 humana producida en *N. benthamiana* como antígeno para el desarrollo de un test diagnóstico de enfermedad celíaca (EC). Dicha enfermedad tiene alta prevalencia en todo el mundo y se encuentra ampliamente subdiagnosticada (Garnier-Lengliné y col. 2015), ya que sólo 1 de cada 7 pacientes está diagnosticado (Rubio-Tapia y col. 2009). En Argentina, la prevalencia es tan alta como en Europa Central (Gomez y col. 2001). No se han desarrollado pruebas de detección masiva, ya que los métodos de diagnóstico disponibles basados en la detección de auto-anticuerpos que reconocen TG2 son caros (\$127 el servicio por paciente, MANLAB®). Para desarrollar un test de alta sensibilidad y especificidad se requiere una fuente de TG2 recombinante humana debido a que presenta un reconocimiento superior a la TG2 de cobayos (Sárdy y col. 1999, Rostom y col. 2006). La TG2 humana producida en *E. coli* o células de insecto se vende en 1100 y 1155 euros/mg, respectivamente ([http://zedira.com/Transglutaminases/Transglutaminase-2\\_3](http://zedira.com/Transglutaminases/Transglutaminase-2_3)). Una de las ventajas del sistema de expresión en planta es el bajo costo de producción en comparación con otras plataformas de expresión, que ronda los

7-9 dólares por Kg. de proteína recombinante, dependiendo de la escala utilizada sin incluir la purificación (Tusé y col. 2015). Teniendo en cuenta los rendimientos de ER-TG2 de 54,5 mg/kg y considerando un costo similar al mencionado, la producción de TG2 por expresión transitoria en tabaco sería considerablemente más económica y permitiría que este antígeno sea más accesible para el desarrollo de pruebas de detección masiva. Cabe destacar que en este trabajo hemos demostrado que tanto ER-TG2 como vac-TG2 fueron reconocidos por los tres anticuerpos monoclonales anti-TG2 y las IgA provenientes de sangre periférica de pacientes enfermos, por lo tanto, ambos antígenos son útiles para el diagnóstico de EC.

*Conclusiones*

En este trabajo se desarrolló un sistema para producir y purificar TG2 de plantas. Como primera estrategia se utilizó el direccionamiento subcelular obteniéndose que las versiones reticular y vacuolar producen mayores rendimientos que las citosólica y secretoria. La segunda estrategia consistió en coexpresar TG2 con ELP o scFv-ELP, obteniéndose mayores niveles de acumulación en presencia de estas moléculas que en su ausencia. En estas condiciones se observó la formación de cuerpos proteicos en el ER.

Para facilitar la purificación de TG2 se diseñó una molécula de captura para realizar una precipitación selectiva. Esta molécula, formada por un anticuerpo simple cadena específico de TG2 fusionado covalentemente a un ELP corto (36 repeticiones) e hidrofóbico, fue producida de manera intacta y eficientemente en hojas de *N. benthamiana*. Se demostró su capacidad de sufrir transiciones térmicas y ser purificada por ciclos de transición inversa. Aunque los niveles de recuperación inicialmente fueron bajos (19%), el agregado de ELP externo permitió alcanzar niveles satisfactorios (83%). Finalmente se probó la capacidad de esta molécula para reconocer y purificar TG2 de plantas o de células Caco-2. La TG2 de células Caco-2 no tiene una *tag* de purificación, lo cual implica que el reactivo de captura podría utilizarse para otras fuentes de TG2 sin *tag*, ya sean recombinantes o nativas. De esta manera se desarrolló un sistema de purificación por precipitación selectiva eficiente aun en condiciones en que la proteína de interés se encuentra en bajas concentraciones.

Finalmente, se demostró que las versiones reticular y vacuolar de TG2 producidas en plantas son reconocidas por sueros de pacientes celíacos pero no por sueros de controles sanos, demostrándose de esta manera la utilidad de la plataforma desarrollada.

*Materiales y Métodos*

## 1. Materiales

### 1.1 Material biológico

#### 1.1.1 Cepas bacterianas

-*Escherichia 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® 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.

**XL1-Blue**: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]. Utilizada en clonados convencionales.

-*Agrobacterium tumefaciens*

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

#### 1.1.2 Células humanas

Se utilizó un cultivo de células de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) como fuente de TG2 utilizado como control y para el experimento de captura por scFv-ELP.

#### 1.1.3 Plantas

*Nicotiana benthamiana* jóvenes (4-5 semanas), crecidas en cámara de 22°C con fotoperiodo 16:8 hs. (luz:oscuridad). Las mismas se cultivaron con sustrato profesional multipropósito *GrowMix* (Terrafertil S.A., Argentina). Se utilizó además el fertilizante de uso foliar y fertirriego *Sampi* (importado por S. Ando y Cía. S.A., Argentina -origen:Japón).

## 1.2 Medios y soluciones

### 1.2.1 Medios de cultivos para bacterias

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

-Medio S.O.C: Triptona 20g/l, Extracto de levadura 10g/l, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, Glucosa 20mM.

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

-Medio de infiltración (MI): MgCl<sub>2</sub> 10mM, 10 mM ácido morfolinoetansulfónico (MES) pH 5.7.

### 1.2.2 Soluciones

-PBS: 10mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 2.7mM KCl, pH=7.4.

-TAE 50X: 2 M Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0.

-TBS 10X: 1,50 M NaCl, 100 mM Tris, pH8.0.

-*Buffer* de Separación 4X: 1.5 M Tris-HCl, 0.4% p/v SDS, pH 8.8.

-*Buffer* de Stacking 4X: 0.5 M Tris-HCl, 0.4% p/v SDS, pH 6.8.

-*Buffer* muestra para proteínas 4X: 1 M Tris-HCl, 2% p/v SDS, 50% v/v glicerol, 0,2% Azul de Bromofenol, pH 8.

-*Buffer* de siembra para DNA 4X: 20 mM Tris, 50 % v/v glicerol, 1 % p/v Azul de Bromofenol, 2 mM EDTA pH 8,0.

-*Buffer* de corrida 10X: 0,25 M Tris, 1,92 M glicina, 1% SDS, pH8.3.

-*Buffer* de transferencia 10X: 0,25 M Tris, 1,92 M glicina, pH8.3 (al 1X se le adiciona 20% metanol).

-*Buffer* de *stripping*: 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl, 100 mM β<sub>2</sub>-mercaptoetanol.

-*Buffer* de extracción: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 10mM EDTA, 10 mM PMSF, pH 6 para fusiones a ELP y pH 7.4 para TG2.

-*Buffer* de elución: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4.5.

-Acrilamida-Bis acrilamida 30,8% p/v: 30% p/v acrilamida, 0.8% p/v bisacrilamida.

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

### 1.2.3 Soluciones de antibióticos

Para la selección de bacterias las soluciones stock se prepararon con agua estéril a una concentración 1000 veces superior a la de trabajo (1000x). Las concentraciones de las soluciones stock fueron Kanamicina (Sigma Aldrich, Catalog. # K4378), y Gentamicina (Sigma Aldrich, Catalog. # G6896).

### 1.3 Reactivos

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

- Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.)
- Promega (Madison, EE.UU.)
- New England Biolabs, NEB (Beverly, EE.UU.)
- Life technology (EE.UU)
- PIERCE (Pierce Rockford, Illinois EEUU) Biotechnology.
- Roche (Basilea, Suiza)
- BioAmerica Inc. (Miami, FL, USA)

### 1.4 Vectores plasmídicos y secuencias sintéticas

#### 1.4.1 Plásmidos comerciales

-pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> TA (Life Technologies Invitrogen, Catalog # K240020). Este vector pertenece al sistema de clonado TOPO y permite el clonado direccional y eficiente de productos de PCR con extremos romos. Es utilizado como vector de clonado para producir “clones de entrada” para la reacción Gateway.

-pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> TA (Life Technologies- Invitrogen, Catalog # K252020). Este vector pertenece al sistema de clonado TOPO y produce un clonado no direccional y eficiente de productos de PCR con extremos con una adenosina protruyente. Se utilizó como vector de clonado para producir “clones de entrada” para la reacción Gateway.

#### 1.4.2 Plásmidos contruidos en nuestro laboratorio

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

Plásmidos utilizados para agroinfiltración o de partida para clonados:

-pRTL-vac-TG2	-pCR8-scFv <sub>2</sub>	-pGWB2-scFv <sub>2</sub>
-pBLTi-ER-TG2	-pCR8-scFv <sub>3</sub>	-pGWB2-scFv <sub>3</sub>
-pBLTi-sec-TG2	-pCR8-scFv <sub>3</sub> -ELP	-pGWB2-scFv <sub>3</sub> -ELP
-pBLTi-cyto-TG2	-pCR8-RFP-scFv	-pGWB2-RFP-scFv
-pCR8-scFv	-pGWB2-scFv	

#### 1.4.3 Plásmidos cedidos por otros laboratorios

- pGWB2 (Nakagawa y col. 2007)
- pEAQ-HT-DEST1 (Sainsbury y col. 2009)
- pET28-htTG (Bayardo y col. 2012)
- pBIN61-p19 (Voinnet y col. 2003)
- pBIN20-ER-Cherry (Nelson y col. 2007)

#### 1.4.4 Secuencia sintética de ELP

El gen codificante para el ELP que contiene 36 repeticiones del pentapéptido VPGXG donde el residuo X fueron V y F en relación 8:1 se compró sintético a la empresa GenScript Corp (Hong Kong, China). La secuencia codificante para ELP(V8F) fue optimizada de acuerdo al uso de codones para *Nicotiana benthamiana* empleando un algoritmo propio (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4100>), que además ajusta el contenido de GC al óptimo del sistema y que mejora la estabilidad del ARNm, remueve secuencias que forman lazos, y elementos *cis* como sitios potenciales de *splicing*, TATA box, sitios de entrada de ribosomas, etc. La construcción comprende además en el extremo 5' la secuencia codificante para un péptido señal secretorio proveniente de inmunoglobulina G de ratón que funciona correctamente en plantas (Restrepo y col. 1990). En el extremo 3' se encuentran fusionadas las secuencias codificantes para generar el tag de 6 histidinas y la señal de retención en retículo endoplásmico SEKDEL. El proveedor entrega la secuencia incorporada en el sitio de clonado múltiple

del plásmido pUC57. El clonado se realizó como se detalla en la sección 2.1 del capítulo de Resultados.

### 1.5 Primers

Los *primers* específicos utilizados figuran en la Tabla M1. Los genes amplificados por PCR fueron: el gen codificante de la transglutaminasa tisular humana (TG2) (P1 y P2, 2,1 Kpb), la proteína fluorescente roja mCherry (P3 y P4, 0,8 Kpb) y ELP(V8F)36 (P5 y P6, 0,7 Kpb).

**Tabla M1.** *Primers* utilizados.

Primer	Denominación original	Secuencia (5' a 3')	Blanco	Observaciones
P1	5PSTTG	GTGGGTACCCAATGGCCGA GGAGCTGGTC	Extremo 5' htTG	Adiciona el péptido señal y el sitio <i>KpnI</i>
P2	3tTG-gateway	CTAGGCGGGGCCAATGATG AC	Inicio de la secuencia poli A del 35S	Adiciona el sitio <i>HindIII</i>
P3	FCherry-Xho-SP-TOPO	CACCCTCGAGCCGACCTCG ACCTAGAAAGAGAAGGAGGA CAGTCCTTCGACGTCCATGG TGAGCAAGGGCGAGGAG	Extremo mCherry 5'	Adiciona el péptido señal y el sitio <i>XhoI</i>
P4	R-Cherry-Kpn-Hind	TATTAAGCTTGGTACCCAGG TGGACCTGGAGGCCATGCC GCCGGTGGAGTG	Extremo mCherry 3'	Adiciona los sitios <i>KpnI</i> y <i>HindIII</i>
P5	FSP-ELP	ATGGGATGGTCTTGGATTTT CC	Inicio de la secuencia del péptido señal	Adiciona el sitio <i>BglI</i>
P6	RHis-SEKDEL	TCATAACTCATCCTTTTCACT G	Secuencia de histidinas y señal SKDEL	Adiciona el sitio <i>PfIMI</i>

### 1.6 Enzimas y kits enzimáticos

Enzimas de restricción: *KpnI*<sup>1</sup>, *HindIII*<sup>1</sup>, *MluI*<sup>1</sup>, *XhoI*<sup>2</sup>, *BglI*<sup>3</sup> y *PfIMI*<sup>3</sup>. Las enzimas fueron comercialmente adquiridas junto con sus correspondientes *buffers* de reacción, a los proveedores siguientes, según se indica:

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

Otras enzimas:

-*Taq* DNA polimerasa (Productos BioLógicos, Bernal, Argentina).

-*Pfu* DNA polimerasa (Invitrogen, California, Estados Unidos)

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

*Kits* enzimáticos:

-LR Clonase® Mix (Life Technologies–Invitrogen, California, Estados Unidos) utilizado para catalizar la reacción de recombinación Gateway.

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

### **1.7 Herramientas bioinformáticas utilizadas para el análisis de las secuencias y diseño de los *primers***

Las secuencias nucleotídicas codificantes de las proteínas a clonar, así como las secuencias aminoacídicas, fueron obtenidas de la base de datos de Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Se utilizó el software Primer Designer 5, versión 5.11 (Sci Ed Central) para el diseño y análisis de *primers* de amplificación. También se empleó Clone Manager 7, versión 7.11 (Sci Ed Central) para simular reacciones de PCR, que permitieron verificar la continuidad de los marcos de lectura de las construcciones durante la adición de sitios de restricción, y el clonado de las construcciones obtenidas en los vectores de clonación y expresión. Estos vectores fueron virtualmente digeridos con enzimas de restricción y de esta manera se establecieron los patrones de peso molecular esperados luego de las mismas.

### **1.8 Anticuerpos**

Para la detección de TG2 se utilizaron los tres anticuerpos monoclonales específicos 2G3, 5G7 y 4E1 producidos por el Dr. Fernando Chirido. Los anticuerpos monoclonales reconocen diferentes epitopes de TG2: 2G3 (aa 314-329), 5G7 (aa 548-558) y 4E1 (aa 637-648) (Di Niro y col. 2005). Los sueros de pacientes fueron obtenidos de un banco de sueros previamente caracterizados [Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)]. Los pacientes celíacos fueron diagnosticados en base al historial clínico, examen histológico y serología positiva. Los sueros negativos utilizados como control fueron tomados de voluntarios sanos no celíacos. Los anticuerpos primarios comerciales utilizados fueron anti-GFP de ratón (Sigma-Aldrich, product # G1546), anti-RFP de conejo (Thermo Scientific Pierce, product # R10367) y anti-Histidinas de ratón (GE Healthcare, coding # 27-4710-01). Los anticuerpos

secundarios fueron anti-mouse IgG (H+L) de cabra conjugado con biotina (Thermo Scientific Pierce, product # 31802), anti-rabbit IgG (H+L) de cabra conjugado con biotina (Thermo Scientific Pierce, product # 31820), estreptavidin conjugada con HRP (Thermo Scientific Pierce product # 21130) y anti-human IgA de ratón conjugado con HRP (Thermo Scientific Pierce product # SA135467).

## 2. Metodologías

### 2.1 Minipreparación de DNA plasmídico

La purificación de DNA plasmídico se realiza mediante el método de lisis alcalina utilizando el kit comercial HiYield™ Plasmid Mini Kit YPD100 (BioAmerica Inc), según el protocolo recomendado por el fabricante.

### 2.2 Digestiones enzimáticas

Para *MluI*, la reacción se produjo utilizando 5 U de la enzima en el *buffer* recomendado por el fabricante y 10 µl de la preparación del plásmido, en un volumen final de 30 µl con agua bidestilada estéril. Para las demás enzimas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl, utilizando 10 U de cada enzima en el *buffer* recomendado por el fabricante y 5 µl de la preparación de plásmido. Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37 °C de 1 a 3 horas, según el caso.

### 2.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Las muestras de DNA, tanto plasmídico como productos de digestión enzimática y fragmentos de amplificación de PCR, fueron analizadas en geles de agarosa 0,8 % p/v. La agarosa se disolvió en *buffer* TAE y luego se adicionó bromuro de etidio (BrEt) que permite la visualización de las bandas en la luz ultravioleta. Las muestras se mezclaron con 1/4 volumen de *buffer* 4X de siembra para DNA previo al sembrado de las mismas. Las electroforesis fueron llevadas a cabo en *buffer* TAE 1X 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.

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

La purificación de los fragmentos de DNA provenientes de digestiones enzimáticas y productos de amplificación de PCR, fue llevada a cabo con el kit de purificación HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction Kit YDF 100 (BioAmerica Inc) según el protocolo recomendado por el fabricante. Se cortan las bandas del gel de agarosa que contienen los fragmentos de DNA de interés y se colocan en un tubo de 1,5 ml. Posteriormente se adicionan 0,5 ml de *buffer* de dilución (DF *buffer*) y se incuban a 55 °C durante 10 minutos, luego se dejan enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Las muestras se transfieren a las columnas de purificación (DF Column) donde son sometidas a varios pasos de lavado y finalmente el DNA es eluído de la columna con agua bidestilada estéril, recuperándolo en un tubo de 1,5 ml estéril. Las muestras de DNA purificadas fueron almacenadas a -20 °C.

#### **2.5 Reacciones de PCR**

Se utilizaron las DNA polimerasas termoestables *Taq* y *Pfu*, la composición de la mezclas de reacción para cada una de ellas se presenta en la Tabla M2. La reacciones de PCR que se realizaron para poner a punto las condiciones de amplificación o para el *screening* de los posibles clones, fueron llevadas a cabo en un volumen final de 15 µl utilizando la DNA polimerasa *Taq*. En el caso de los PCR preparativos se utilizó un volumen final de 50 µl y la DNA polimerasa *Pfu*. Todo el proceso previo a la amplificación se realiza en hielo.

El programa de amplificación utilizado para cada enzima se encuentra detallado en la Tabla M3. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un ciclador térmico Gradient MyCycler™ (Bio-Rad).

**Tabla M2.** Mezclas de PCR utilizadas

<i>Pfu</i> DNA polimerasa		<i>Taq</i> DNA polimerasa	
Componente	Concentración final	Componente	Concentración final
<i>Primer</i> reverso	0,3 $\mu$ M	<i>Primer</i> reverso	0,3 $\mu$ M
<i>Primer</i> directo	0,3 $\mu$ M	<i>Primer</i> directo	0,3 $\mu$ M
<i>Buffer Pfu</i> 10X	1X	<i>Buffer taq</i> 10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dNTPs	0,4 mM	dNTPs	0,4 mM
Enzima	2-5 U	Enzima	2-5 U

**Tabla M3.** Programas de amplificación utilizados en las reacciones de PCR.

Etapa	Temperatura (°C)			Tiempo (minutos)		
	TG2	ELP	RFP	TG2	ELP	RFP
I) Desnaturalización inicial	94	94	94	94	94	94
II) Apareamiento de <i>primers</i>	60	57	55	0,5	0,5	0,5
III) Amplificación	72/68*	72	72/68*	2	1	1
IV) Desnaturalización	94	94	94	0,5	0,5	0,5
V) Extensión final	72/68*	72	72/68*	10	10	10

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

\* Se utilizó 72 °C para *Taq* y 68°C para *Pfu*

## 2.6 Clonado en el vector pENTR™/D-TOPO®

El clonado de fragmentos de TG2 o RFP, amplificados por PCR con ADN-*Pfu* polimerasa, se realizó mediante la reacción TOPO a cargo de la enzima TOPO isomerasa, que se encuentra conjugada al vector pENTR™/D-TOPO. Este proceso no requiere un paso de ligación. Para llevarla a cabo se incubó a temperatura ambiente 2  $\mu$ l del fragmento amplificado con 0,5  $\mu$ l del vector pENTR/D-TOPO y 0,5  $\mu$ l de solución salina durante 2 hs. El volumen total de la mezcla se utilizó para transformar células competentes químicas de *E. coli* DH5- $\alpha$  mediante *shock* térmico. Las células transformadas se incubaron en medio agar LB a 37 °C durante 24 hs, la selección se realizó a través de la resistencia a kanamicina proporcionada por el plásmido.

## 2.7 Clonado en el vector pCR8/GW/TOPO®

Para los clonados de ELP y RFP se amplificaron por PCR con *Taq* sus secuencias codificantes y llevo a cabo la reacción TOPO con el vector

pCR8/GW/TOPO. La mezcla de reacción consistió de 0,5 µL de solución salina, 0,5 µL de vector pCR8/GW/TOPO (10 ng/µl) y 2 µL de producto de PCR, previamente purificado a partir de un gel de electroforesis de agarosa. La mezcla se incubó 2 hs a temperatura ambiente. El volumen total de la mezcla se utilizó para transformar células competentes químicas de *E. coli* DH5-α mediante *shock* térmico. Las células transformadas se incubaron en medio agar LB a 37 °C durante 24 hs, con espectinomicina como factor de selección. Se seleccionaron los clones que tenían la orientación correcta mediante una PCR de colonias utilizando el *primer* FwM13 (contemplado en el *kit* de clonado) que une en el vector y el *primer* reverso de cada construcción. Los plásmidos que amplificaron un fragmento del tamaño esperado se consideraron positivos.

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

La recombinación sitio específica se realizó entre el inserto de interés y el vector pGWB2. Se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche 2 µl de cada componente de DNA y 0,5 µl de la enzima LR clonasa. Luego se adicionaron 0,5 µl de proteinasa K para producir inactivación de la enzima incubando 10 min a 37 °C. Con la mezcla obtenida se transformaron 7 µl de células competentes One Shot® Chemically Competent *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Las transformantes fueron seleccionadas mediante incubación en medio de cultivo agar LB con Kanamicina, este antibiótico corresponde a la resistencia codificada en el vector pGWB2.

## **2.9 Transformación química de células competentes de *E. coli* DH5-α y TOP10**

El stock de células competentes se encuentra conservado a -80 °C. De allí es retirado 10 minutos antes de llevar a cabo la transformación y se coloca inmediatamente en hielo, donde las células se descongelan. A continuación se adiciona la cantidad adecuada de plásmido según el caso, y se incuba en hielo durante 30 min. Posteriormente, se procede a realizar el *shock* térmico colocando la preparación en un bloque térmico, previamente ajustado a 42 °C, durante 30 segundos e inmediatamente volver a colocar en hielo durante 2 minutos. Se adiciona 1ml de medio de cultivo S.O.C. (precalentado a 37 °C) y

se incuba 1h a 37 °C con una agitación de 200 rpm en agitador (LabLine). El cultivo se concentra y se siembra, en mechero o flujo laminar, con varilla de vidrio, en placas con agar LB con el antibiótico de selección. Como control se lleva a cabo el mismo procedimiento sin adicionar plásmido a las células, la aparición de colonias indicaría algún tipo de contaminación o problemas con la selección.

## **2.10 Transformación eléctrica de células competentes de *E. coli* DH5- $\alpha$ y *Agrobacterium tumefaciens* GV3101**

El stock de células electrocompetentes se encuentra conservado a -80 °C. Tanto las células como las cubetas estériles de 2 mm (Bio-Rad) se colocan en hielo 10 minutos antes de realizar la transformación. Una vez descongeladas, se ponen en contacto 100  $\mu$ l de células con 0,5-5  $\mu$ l de la preparación de plásmido (necesariamente libre de electrolitos), se coloca inmediatamente en la cubeta y se incuba 1 minuto en hielo. A continuación, se coloca la cubeta en el electroporador (Bio-Rad Gene Pulser II) y se procede a electroporar bajo las siguientes condiciones:

Capacitancia: 25  $\mu$ F

Voltaje: 2.5 KV

Resistencia: 200  $\Omega$

Inmediatamente después de electroporar se adiciona a la cubeta 1 ml de medio S.O.C. (pre-calentado a 37 °C). La mezcla se transfiere a un tubo estéril y se incuba en distintas condiciones según la bacteria transformada. Para *E. coli* la incubación es de 1 hora a 37 °C, mientras que si se trata de *A.tumefaciens* se incuba toda la noche en agitación (200 rpm) a 28 °C. Posteriormente, se concentra por centrifugación el cultivo y se siembra con varilla de vidrio en placas LB con el antibiótico de selección adecuado, siempre en esterilidad. 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 o selección deficiente.

## **2.11 PCR de colonias**

Se utilizó este método para realizar un rápido *screening* de los clones obtenidos. Se prepara una premezcla de PCR (todos los componentes excepto

el molde de DNA) que contemple el volumen necesario para las colonias que de deseen evaluar y los controles apropiados. Se procede a alicuotar la mezcla en los tubos de PCR (se trabaja en hielo), y a continuación con una punta de micropipeta se toma una fracción de una de las colonias a analizar y se introduce en el tubo de PCR a modo de molde de DNA. Inmediatamente después se utiliza el mismo *tip* para sembrar una placa de medio LB con el antibiótico de selección. Los tubos se colocan en el termociclador y se procede con la reacción de la misma forma que realizaron otras reacciones de PCR.

### **2.12 Agroinfiltración de plantas *N. benthamiana***

Los ensayos de agroinfiltración se efectuaron de acuerdo al método descrito por Batoko y col., (2000). Para ello se cultiva un clon de *A. tumefaciens*, conteniendo el plásmido binario correspondiente, en medio YEB líquido con los antibióticos adecuados a 28 °C durante toda la noche, en oscuridad y agitación (200 rpm). Se procede a diluir el cultivo, trabajando siempre en esterilidad, hasta obtener una DO<sub>600</sub> de entre 0,1 y 0,5 dependiendo del experimento y se lo induce por el agregado de acetosiringona (concentración final 200 mM). Durante 2-4 hs el cultivo se incubaba a 28°C. A continuación se centrifuga el cultivo en tubos de 1,5 ml y se resuspenden las células en MI manteniendo el volumen original. Se utilizaron las hojas 3, 4 y 5 de la planta contando desde el brote hacia la base. Se infiltró la superficie abaxial de las hojas de *N. benthamiana* haciendo presión con una jeringa de 1 ml sin aguja cargada con la suspensión de bacterias. Las plantas se mantienen en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz, a 22 °C.

### **2.13 Extracción de proteínas en hojas de plantas**

La toma de muestra a pequeña escala se realizó colectando 2 discos de hoja de 5 plantas diferentes agroinfiltradas con la construcción de interés, obteniendo así 10 discos para cada muestra. Cada experimento se realizó por triplicado. Para infiltraciones a gran escala se tomaron las hojas completas.

La extracción de las proteínas solubles de *N. benthamiana* se realizó a partir de muestras conservadas a -80°C. Para la extracción a partir de discos de hoja, se enfría el tubo 1,5 ml conteniendo los mismos en nitrógeno líquido y se muelen con émbolo una punta de teflón. Para el caso de extracciones a

partir de hojas completas, se pesan inicialmente en balanza analítica y se procede a molerlas en mortero con nitrógeno líquido. A continuación se adiciona un volumen de *buffer* de extracción igual a la cantidad de hojas procesadas (o 10  $\mu$ l por disco) y 25  $\mu$ g de PVPP (polivinil polipirrolidona) por cada gramo de muestra. Luego se extrae en agitación durante 15 minutos a 4°C y para el caso de extracciones de mayor escala se filtra el extracto en membrana *Miraclloth*. La solución obtenida se centrifuga a 4 °C a 20000 xg durante 15 minutos para baja escala y a 30000 xg durante 30 minutos para volúmenes mayores a 10 ml. Para el caso particular de extractos que posteriormente serán tratados por ITC se lleva a cabo la centrifugación a 60000 xg a 4 °C durante 45 minutos para eliminar completamente los fragmentos celulares que se insolubilizarían por el agregado de sales posterior. Se toma el sobrenadante y el extracto se procesa o se adiciona glicerol y se conserva a -80 °C.

Para realizar una extracción total se colocan los discos de hojas transformadas congeladas en tubo de 1,5 ml y se muele con un émbolo adecuado. Se adiciona 10  $\mu$ l de *buffer* muestra por cada disco y se incuba a 95 °C durante 5 minutos, para desnaturalizar proteasas y evitar que se degrade la proteína de interés.

## 2.14 Cuantificación de proteínas

Para los extractos realizados en condiciones no desnaturalizantes y las proteínas purificadas por ITC se cuantificaron las proteínas solubles con el kit de determinación de proteínas por Ácido Bicinconínico (Sigma-Aldrich, Product # BCA-1), según las instrucciones del mismo. Se utilizó albúmina de suero bovino como estándar.

La concentración de TG2 purificada se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV/Visible (Thermo Scientific, USA). Para determinar la concentración de TG2 en los extractos se realizó una curva de calibración a partir de una muestra de TG2 purificada cuantificada previamente por el método de Bradford. Para ello se sembraron en el gel diferentes cantidades de TG2 purificada junto con 20  $\mu$ g de TSP de cada extracto a cuantificar. Luego se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se realizó el

inmunoblot como se detalló anteriormente. La señal obtenida para los extractos se transformó a  $\mu\text{g}$  de TG2 según la curva de calibración obtenida.

## 2.15 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 a continuación. Se prepara el gel de separación según la composición indicada en la Tabla M4, se agregó el TEMED y el persulfato al momento de armar el gel, se mezcla suavemente para evitar la incorporación de aire y se coloca entre los vidrios con la ayuda de una pipeta automática. Una vez cargado  $\frac{3}{4}$  de volumen se agrega etanol 70 % p/v sobre el mismo para evitar que el oxígeno del aire inhiba la polimerización de la superficie. Se espera aproximadamente 30 minutos que polimerice. Posteriormente se retira el etanol y se prepara el gel de apilamiento, se coloca entre los vidrios y se ubica el peine para formar las calles. Se deja gelificar 30 minutos a temperatura ambiente o bien en estufa a 37 °C.

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 o 2 h con agitación suave. Se retiró la solución de tinción y se retiró el exceso de colorante, mediante incubación en solución decolorante (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.

**Tabla M4:** Composición de los geles

Componente	Concentración del gel	
	5 %	12,50 %
Acril/Bis 30,8 %	1.6	4.1
Tris 1 M pH=8,8	1.25	3.1
SDS 20%	0.05	0.05
H <sub>2</sub> O	7.05	1.7
Persulfato 10%	0.05	0.05
Glicerol	1	1
TEMED	0.006	0.006
Vol final	10	1

## 2.16 Inmunoblot

**-Transferencia:** Luego de efectuada la electroforesis, los geles de poliacrilamida fueron equilibrados durante 5 minutos en *buffer* de transferencia junto con la membrana de nitrocelulosa y los papeles de filtro (Schleicher & Schuell Bioscience, Keene, NH). Se montó el *cassette* del equipo electrotransferencia Fastblot B44 (Biometra) colocando el gel y la membrana de nitrocelulosa entre papeles de filtro, asegurando que no queden burbujas de aire entre las capas. Se monta el equipo y se aplica una corriente de 5mA por cm<sup>2</sup> durante 45 minutos.

**-Confirmación de la transferencia-Tinción con 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:** Se ensayaron varias condiciones, aquí se detalla únicamente la que tuvo éxito. Las membranas se incubaron 1 hora a 37 °C en solución de bloqueo 5 % de leche descremada en PBS. Luego se lavaron 6 veces durante 5 minutos con el *buffer* PBS durante y se incubaron con el anticuerpo primario elegido durante 12 hs. a 4 °C. Según la proteína a detectar se utilizó como anticuerpo primario ascitis conteniendo el anticuerpo monoclonal 2G3 anti-TG2 de ratón (dilución 1:500), el anti-Histidinas de ratón (dilución 1:1000), anti-GFP de ratón (dilución 1:1000) o anti-RFP de conejo (dilución 1:1000). A continuación de lava la membrana de la misma manera que antes y se incuba

con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con biotina (dilución 1:20000) o anti-conejo conjugado con biotina (dilución 1:20000). Luego de 1 hora de incubación a 37 °C, se descartó la dilución del segundo anticuerpo y se lavaron las membranas con PBS 6 veces durante 5 minutos cada vez. A continuación se incubó con estraptavidina conjugado con peroxidasa (dilución 1:20000) durante 30 minutos a 37 °C. Luego se lava la membrana de la misma manera que los pasos previos. La señal inmunoreactiva fue detectada utilizando como sustrato la mezcla de solución A (luminol 0,044 gr/ml -Sigma, número de catálogo A8511- en DMSO, 50 µl; ácido p-cumárico 0,015 gr/ml en *buffer* separador diluido 1:10) con igual volumen de solución B (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% en *buffer* separador diluido 1:10).

### **2.17 Stripping**

Para reutilizar las membranas de nitrocelulosa, y así poder revelarlas con otro anticuerpo de interés, se procedió a eliminar los anticuerpos unidos mediante una incubación en *buffer* de *stripping* a 55 °C durante 30 minutos. Luego se lavó tres veces con agua destilada durante 5 minutos. A continuación, se bloqueó la membrana nuevamente con PBS con 5% p/v de leche en polvo descremada y se desarrolló el inmunoblot normalmente.

### **2.18 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

Para la detección de TG2 las muestras de hoja de *N. benthamiana* fueron colectadas a 5 días post-infiltración (dpi) ya que corresponde al máximo nivel detectado de esta proteína. Se ensayaron al menos 3 replicados biológicos, cada replicado contenía muestras de tejido infiltrado de 5 plantas diferentes. La extracción se realizó como se indicó previamente y cada muestra fue analizada por duplicado. Cada fosa fue sensibilizada con ~100 µg de proteínas solubles totales (TSP) o 1 µg de TG2 purificada de hojas en PBS con 5 mM CaCl<sub>2</sub> por absorción pasiva a 4 °C durante toda la noche (Sulkanen y col. 1998). Luego se bloqueó con 5% leche descremada en PBS durante 1 h a 37 °C. A continuación se adicionaron 100 µl de anticuerpo primario mAb 2G3 específico de TG2 a una dilución 1:500 (Di Niro y col. 2005) o dilución 1:50 de un pool de suero de 12 pacientes y se incubó 16 hs a 4 °C. Por último, como anticuerpo secundario se incubó con anti-ratón IgG conjugado con

biotina(dilución 1:20000) y streptavidina conjugada con HRP (dilución 1:20000) o anti-humano conjugado con HRP (dilución 1:1000) durante 1 h a 37 °C. Para el revelado se utilizó el sustrato tetramethylbenzidine (TMB)–peroxidasa (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) y la densidad óptica se midió a 630 nm.

Para la detección de scFv-ELP, ELP y RFP-ELP se sensibilizaron las fosas con ~100 µg de TSP por absorción pasiva a 4 °C durante toda la noche. Luego se bloqueó con 5 % leche descremada en PBS durante 1 h a 37 °C y a continuación se adicionaron 100 µl de anticuerpo primario anti-His dilución 1:1000 durante 1 h a 37°C. Por último, como anticuerpo secundario se incubó con anti-ratón IgG conjugado con biotina (dilución 1:20000) y estreptavidina conjugada con HRP (dilución 1:20000), ambos durante 1 h a 37 °C. El revelado se llevó a cabo como en el caso anterior. Para realizar la curva de calibración se utilizó una proteína purificada de *E. coli* con *tag* de histidinas previamente cuantificada.

## **2.19 Purificación de proteínas por ciclos de transición térmica por centrifugación (cITC) o filtración (mITC)**

El extracto realizado con *buffer* de extracción se llevó a concentración 3 M de NaCl por adición de la sal sólida o a concentración 0,12 o 0,25 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por adición de un volumen adecuado de solución saturada de la sal. Una vez disuelta la sal se centrifugó nuevamente a 60000 xg a 4 °C durante 45 minutos para eliminar proteínas insolubilizadas por la fuerza iónica del medio. El sobrenadante se incubó 20 minutos a diferentes temperaturas de agregación para inducir el colapso de ELP: 40 o 60 °C para NaCl; 15 o 30 °C para  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Para el caso de cITC a continuación se centrifugó a 8000 xg a temperatura ambiente durante 20 minutos. El precipitado se separó y se resuspendió en un volumen diez veces menor al inicial de *buffer* de baja concentración de sales a 4 °C para resuspender el ELP. Se centrifugó a 15000 xg a 4 °C durante 20 minutos para eliminar proteínas insolubilizadas irreversiblemente (diferentes a ELP). Para incrementar la pureza de la muestra se llevó a cabo una segunda ronda de ITC: se incubó nuevamente a la temperatura de agregación y se centrifugó a temperatura ambiente, se resuspendió en agua ultrapura a 4 °C y centrifugó en frío, obteniendo así ELP

en el sobrenadante y eliminando proteínas de la hoja en el proceso. Para llevar a cabo la mITC, antes de la incubación a la temperatura de agregación, se filtró el extracto con filtro de membrana de nylon de 0.45 micrones y luego por filtro de mezcla de ésteres de 0.2 micrones (Whatman®, Maidstone, Reino Unido). Posteriormente se incubó a la temperatura de agregación durante 20 minutos y se recuperó el ELP colapsado por filtración con membrana de acetato de celulosa de 0.2 micrones. La membrana se lavó con *buffer* de alta concentración de sales en frío y se eluyó la proteína con agua ultrapura.

## **2.20 Purificación de TG2 utilizando la molécula de captura scFv-ELP**

Los experimentos de purificación para evaluar la capacidad de scFv-ELP para recuperar TG2 por ITC se utilizaron dos fuentes del antígeno: extracto de células Caco-2 y extracto de hojas expresando transitoriamente ER-TG2. Para realizar el extracto de células Caco-2 en primer lugar se colectaron las células por centrifugación y se realizó la lisis por resuspensión de las mismas en agua destilada; luego se centrifugó y el sobrenadante se utilizó como fuente de TG2. Para la utilización de ER-TG2 como fuente de antígeno se utilizó un extracto de hoja expresando la proteína realizado en condiciones no desnaturizantes tal como se describió previamente. Los extractos fueron adicionados con NaCl sólido de manera que alcancen una concentración 3 M, que es la condición necesaria para realizar la ITC. Se adicionó a los extractos 10 µg de scFv-ELP purificado por ITC y se incubó a temperatura ambiente de manera que ocurra la interacción antígeno-anticuerpo sin que ELP sufra agregación. A continuación se desarrolló la purificación por ITC como se describió anteriormente.

## **2.21 Purificación de TG2 por cromatografía de afinidad**

Se partió de aproximadamente 20 gr de hojas y se extrajeron las proteínas solubles con *buffer* de extracción sin EDTA a pH 7.4 tal como se indicó previamente. El sobrenadante se incubó durante 1 h a 4 °C con 50 µL Ni Sepharose (GE Healthcare Life Sciences, Argentina S.A.) con agitación suave. Las proteínas unidas a la resina se recuperaron utilizando las columnas que provee el *kit* y se lavó con el *buffer* de extracción cinco veces. Se eluyeron las proteínas con *buffer* de elución de pH 4.5 y posteriormente se neutralizó con NaHCO<sub>3</sub>. Se analizó la pureza por SDS-PAGE.

## 2.22 Medida de fluorescencia

Se midió fluorescencia roja de las muestras conteniendo RFP-ELP y scFv-ELP con un lector de placas BioTek Synergy HT (excitación 530/25nm, emisión 645/40 nm). Todas las muestras fueron analizadas en dos diluciones (1:10 y 1:50) para asegurarse que no saturen y que haya linealidad. Se sembraron 3 fosas de cada muestra y las medidas se realizaron por quintuplicado en unidades arbitrarias (UA). Como blanco se utilizó un extracto de hoja infiltrada con el medio de infiltración, cuya medida de fluorescencia se restó al valor de todas las muestras. La actividad de fluorescencia total se calculó como la fluorescencia promedio para el volumen de muestra total. La actividad específica se calculó como actividad de fluorescencia total sobre la cantidad de proteínas totales, mientras que el factor de purificación se definió como actividad específica de la etapa respecto de la actividad específica del extracto crudo.

## 2.23 Procesamiento de datos por densitometría del inmunoblot

Para efectuar las medidas de intensidad de banda se utilizó el software Image J. Se calculó el histograma correspondiente a la zona de la banda que se desea medir, se traza una línea de base y se selecciona la zona bajo la curva correspondiente a la banda. Se determinaron de esta forma en unidades arbitrarias las intensidades de las bandas y, teniendo en cuenta los volúmenes de cada muestra, se calcularon las señales totales. Con esta información se calculó el porcentaje de recuperación para cada purificación como intensidad de la muestra multiplicado por 100 sobre intensidad total inicial.

## 2.24 Microscopía de disección fluorescente y microscopía de fluorescencia confocal

Luego de 5 días de incubación postinfiltración, las hojas agroinfiltradas fueron analizadas por microscopía. En el caso de la microscopía de disección fluorescente, se utilizó lupa UV Leica MZ10F con filtros GFP Plant (excitación 470/40nm, emisión 525/50 nm) y DsRed (excitación 545/30nm, emisión 620/60 nm) acoplado a una cámara CCD refrigerada (Leica DFC 490). Los estudios de microscopía de fluorescencia confocal se realizaron utilizando un Microscopio Invertido DMI 6000 CS motorizado acoplado a un Láser Confocal Espectral

(CLSM) Leica TCS SP5 equipado con 7 líneas de láser, AOTF (Acousto-Optic Tunable Filter), AOBS (Acousto-Optical Beam Splitter) y sistema de barrido (Tandem-scanning system SP5). Las estructuras subcelulares fueron visualizadas utilizando el objetivo de aceite 63x. RFP (mCherry) fue excitada a 543 nm (Laser HeNe 1.5mW) y detectada en el rango 570–630 nm.

### **2.25 Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Prism 6 (GraphPad Software, GraphPad Inc., La Jolla, CA). Se utilizaron los *test one-way ANOVA* y *Tukey's* de comparaciones múltiples para determinar valores medios con diferencias estadísticamente significativas. Alternativamente se utilizó un *test de student* para el cual se consideró un p-valor <0.05 como diferencia estadísticamente significativa.

*Bibliografía*

- Acevedo, G. R. (2012). Construcción de distintas formas multiméricas de un polímero similar a elastina (ELP) fusionado a un scFv y su aplicación en el proceso downstream de recuperación de proteínas sintetizadas en plantas. Tesis de Licenciatura Tesis de Grado, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Arnold, L. and R. Chen (2014). "Novel thermo-responsive fucose binding ligands for glycoprotein purification by affinity precipitation." Biotechnology and Bioengineering **111**(2): 413-417.
- Arrizubieta, M. J. (2007). Transglutaminases. Industrial Enzymes, Springer: 567-581.
- Arzola, L., J. Chen, K. Rattanaporn, J. M. Maclean and K. A. McDonald (2011). "Transient co-expression of post-transcriptional gene silencing suppressors for increased in planta expression of a recombinant anthrax receptor fusion protein." International Journal of Molecular Sciences **12**(8): 4975-4990.
- Bataille, L., W. Dieryck, A. Hocquellet, C. Cabanne, K. Bathany, S. Lecommandoux, B. Garbay and E. Garanger (2016). "Recombinant production and purification of short hydrophobic Elastin-like polypeptides with low transition temperatures." Protein Expr Purif **121**: 81-87.
- Baulcombe, D., O. Voinnet and A. Hamilton (2000). ENHANCED TRANSGENE EXPRESSION BY CO-EXPRESSION WITH A SUPPRESSOR OF POST-TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING (PTGS). **Patent EP 1232274 B1**.
- Baulcombe, D. C., O. Voinnet and A. J. Hamilton (2002). Enhanced transgene expression by co-expression with a suppressor of post-transcriptional gene silencing (PTGS) UK, PLANT BIOSCIENCE LIMITED, US7217854 (B1) **WO/2001/038512**.
- Bayardo, M., F. Punzi, C. Bondar, N. Chopita and F. Chirido (2012). "Transglutaminase 2 expression is enhanced synergistically by interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  in human small intestine." Clinical & Experimental Immunology **168**(1): 95-104.
- Benchabane, M., C. Goulet, D. Rivard, L. Faye, V. Gomord and D. Michaud (2008). "Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories." Plant biotechnology journal **6**(7): 633-648.
- Blackwell, P. J., P. G. Hill and G. K. T. Holmes (2002). "Autoantibodies to human tissue transglutaminase: Superior predictors of coeliac disease." Scandinavian Journal of Gastroenterology **37**(11): 1282-1285.
- Boothe, J., C. Nykiforuk, Y. Shen, S. Zaplachinski, S. Szarka, P. Kuhlman, E. Murray, D. Morck and M. M. Moloney (2010). "Seed-based expression systems for plant molecular farming." Plant Biotechnology Journal **8**(5): 588-606.
- Cafiero, J. H. (2012). Construcción de scFv multiméricos y estudio de su expresión temporal en hojas de Nicotiana benthamiana. Tesis de Licenciatura Tesis de Grado, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Caicedo, R. and I. Hill (2008). Current guidelines for the diagnosis and treatment of celiac disease. Frontiers in celiac disease, Karger Publishers: 107-113.
- Castilho, A. and H. Steinkellner (2016). Transient expression of mammalian genes in *N. benthamiana* to modulate N-glycosylation. Methods in Molecular Biology. **1385**: 99-113.
- Castilho, A., R. Strasser, J. Stadlmann, J. Grass, J. Jez, P. Gatteringer, R. Kunert, H. Quendler, M. Pabst, R. Leonard, F. Altmann and H. Steinkellner (2010). "In Planta protein sialylation through overexpression of the respective mammalian pathway." Journal of Biological Chemistry **285**(21): 15923-15930.
- Cheung, S. C., S. S. Sun, J. C. Chan and P. C. Tong (2009). "Expression and subcellular targeting of human insulin-like growth factor binding protein-3 in transgenic tobacco plants." Transgenic research **18**(6): 943-951.
- Chiang, C.-J., H.-C. Chen, Y.-P. Chao and J. T. Tzen (2007). "One-step purification of insoluble hydantoinase overproduced in *Escherichia coli*." Protein expression and purification **52**(1): 14-18.
- Chilkoti, A., T. Christensen and J. A. MacKay (2006). "Stimulus responsive elastin biopolymers: applications in medicine and biotechnology." Current opinion in chemical biology **10**(6): 652-657.
- Chin, J. X., B. K.-S. Chung and D.-Y. Lee (2014). "Codon Optimization OnLine (COOL): a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design." Bioinformatics **30**(15): 2210-2212.
- Circelli, P., M. Donini, M. E. Villani, E. Benvenuto and C. Marusic (2010). "Efficient Agrobacterium-based transient expression system for the production of biopharmaceuticals in plants." Bioengineered Bugs **1**(3): 221-224.

- ClinicalTrials.gov. (2016). "Immunogenicity of a Quadrivalent Virus-Like Particles (VLP) Influenza Vaccine in Healthy." Retrieved 01/31, 2017, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02768805>.
- Cloutier, S. M., S. Couty, A. Terskikh, L. Marguerat, V. Crivelli, M. Pugnères, J. C. Mani, H. J. Leisinger, J. P. Mach and D. Deperthes (2001). "Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of in vivo biotinylated, phage display-selected scFv fragments on streptavidin." *Molecular Immunology* **37**(17): 1067-1077.
- Conley, A. J., J. J. Joensuu, A. M. Jevnikar, R. Menassa and J. E. Brandle (2009). "Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants." *Biotechnology and Bioengineering* **103**(3): 562-573.
- Conley, A. J., J. J. Joensuu, R. Menassa and J. E. Brandle (2009). "Induction of protein body formation in plant leaves by elastin-like polypeptide fusions." *BMC Biology* **7**: 48.
- Conley, A. J., K. Mohib, A. M. Jevnikar and J. E. Brandle (2009). "Plant recombinant erythropoietin attenuates inflammatory kidney cell injury." *Plant Biotechnol J* **7**(2): 183-199.
- Conrad, U. and U. Fiedler (1998). "Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity." *Plant Mol. Biol.* **38**: 101-109.
- Conrad, U., I. Plagmann, S. Malchow, M. Sack, D. M. Floss, A. A. Kruglov, S. A. Nedospasov, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock." *Plant Biotechnology Journal* **9**(1): 22-31.
- De Jaeger, G., S. Scheffer, A. Jacobs, M. Zambre, O. Zobell, A. Goossens, A. Depicker and G. Angenon (2002). "Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences." *Nat Biotechnol* **20**(12): 1265-1268.
- De Marchis, F., M. Bellucci and A. Pompa (2013). "Traffic of human alpha-mannosidase in plant cells suggests the presence of a new endoplasmic reticulum-to-vacuole pathway without involving the Golgi complex." *Plant Physiol* **161**(4): 1769-1782.
- De Muynck, B., C. Navarre and M. Boutry (2010). "Production of antibodies in plants: Status after twenty years." *Plant Biotechnology Journal* **8**(5): 529-563.
- Dewar, D. H. and P. J. Ciclitira (2005). "Clinical features and diagnosis of celiac disease." *Gastroenterology* **128**(4 Suppl 1): S19-24.
- Di Niro, R., F. Ferrara, T. Not, A. R. M. Bradbury, F. Chirido, R. Marzari and D. Sblattero (2005). "Characterizing monoclonal antibody epitopes by filtered gene fragment phage display." *Biochemical Journal* **388**(3): 889-894.
- Dieterich, W., T. Ehnis, M. Bauer, P. Donner, U. Volta, E. O. Riecken and D. Schuppan (1997). "Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease." *Nature medicine* **3**(7): 797-801.
- Dugdale, B., C. L. Mortimer, M. Kato, T. A. James, R. M. Harding and J. L. Dale (2013). "In plant activation: an inducible, hyperexpression platform for recombinant protein production in plants." *The Plant Cell* **25**(7): 2429-2443.
- Duvenage, L., Hitzeroth, II, A. E. Meyers and E. P. Rybicki (2013). "Expression in tobacco and purification of beak and feather disease virus capsid protein fused to elastin-like polypeptides." *J Virol Methods* **191**(1): 55-62.
- Egelkrout, E., V. Rajan and J. A. Howard (2012). "Overproduction of recombinant proteins in plants." *Plant Science* **184**: 83-101.
- Fabiani, E., E. Peruzzi, A. Mandolesi, G. Garbuglia, G. Fanciulli, A. R. D'Appello, M. Gasparin, E. Bravi, I. Bearzi, R. Galeazzi and C. Catassi (2004). "Anti-human versus anti-guinea pig tissue transglutaminase antibodies as the first-level serological *screening* test for coeliac disease in the general population." *Digestive and Liver Disease* **36**(10): 671-676.
- Fernández, E., C. Blanco, S. Riestra, L. Rodrigo, D. Fuentes, M. Moreno, A. López-Vazquez and C. López-Larrea (2005). "Comparison of six human anti-transglutaminase ELISA-tests in the diagnosis of celiac disease in the Saharawi population." *World Journal of Gastroenterology* **11**(24): 3762-3766.
- Fesus, L. and M. Piacentini (2002). "Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions." *Trends in biochemical sciences* **27**(10): 534-539.
- Fiedler, U., J. Phillips, O. Artsaenko and U. Conrad (1997). "Optimization of scFv antibody production in transgenic plants." *Immunotechnology* **3**(3): 205-216.

- Fischer, R., S. Schillberg, S. Hellwig, R. M. Twyman and J. Drossard (2012). "GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins." Biotechnol Adv **30**(2): 434-439.
- Floss, D. M., U. Conrad, S. Rose-John and J. Scheller (2013). ELP-Fusion Technology for Biopharmaceuticals. Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges: 211-226.
- Floss, D. M., M. Sack, E. Arcalis, J. Stadlmann, H. Quendler, T. Rademacher, E. Stoger, J. Scheller, R. Fischer and U. Conrad (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**(9): 899-913.
- Floss, D. M., M. Sack, J. Stadlmann, T. Rademacher, J. Scheller, E. Stoger, R. Fischer and U. Conrad (2008). "Biochemical and functional characterization of anti-HIV antibody-ELP fusion proteins from transgenic plants." Plant Biotechnol J **6**(4): 379-391.
- Floss, D. M., K. Schallau, S. Rose-John, U. Conrad and J. Scheller (2010). "Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application." Trends in Biotechnology **28**(1): 37-45.
- Fong, B. A., W. Y. Wu and D. W. Wood (2009). "Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution." Protein Expr Purif **66**(2): 198-202.
- Fox, J. L. (2012). "First plant-made biologic approved." Nat Biotech **30**(6): 472-472.
- Galván Cabrera, J. (2010). "La serología diagnóstica en la enfermedad celíaca." Rev Cub Aliment Nutr **220**(2 Supl 1): S33-S35.
- Garabagi, F., M. D. McLean and J. C. Hall (2012). Transient and stable expression of antibodies in nicotiana species. Methods in Molecular Biology. **907**: 389-408.
- Garnier-Lengliné, H., N. Cerf-Bensussan and F. M. Ruemmele (2015). "Celiac disease in children." Clinics and research in hepatology and gastroenterology **39**(5): 544-551.
- Gasbarrini, G., N. Malandrino, V. Giorgio, C. Fundarò, G. Cammarota, G. Merra, D. Roccarina, A. Gasbarrini and E. Capristo (2008). "Celiac disease: what's new about it?" Dig Dis **26**(121-127).
- Ge, X. and C. D. Filipe (2006). "Simultaneous phase transition of ELP tagged molecules and free ELP: an efficient and reversible capture system." Biomacromolecules **7**(9): 2475-2478.
- Gelvin, S. B. (2010). "Plant proteins involved in Agrobacterium-mediated genetic transformation." Annu Rev Phytopathol **48**: 45-68.
- Gelvin, S. B. (2012). "Traversing the Cell: Agrobacterium T-DNA's Journey to the Host Genome." Front Plant Sci **3**: 52.
- Gleba, Y. Y., D. Tusé and A. Giritch (2014). Plant viral vectors for delivery by Agrobacterium. Current Topics in Microbiology and Immunology. **375**: 155-192.
- Gomez, J. C., G. Selvaggio, B. Pizarro, M. J. Viola, G. La Motta, E. Smecuol, R. Castelletto, R. Echeverría, H. Vazquez, R. Mazure, A. Crivelli, E. Sugai, E. Mauriño and J. C. Bai (2002). "Value of a *screening* algorithm for celiac disease using tissue transglutaminase antibodies as first level in a population-based study." American Journal of Gastroenterology **97**(11): 2785-2790.
- Gomez, J. C., G. S. Selvaggio, M. Viola, B. Pizarro, G. La Motta, S. De Barrio, R. Castelletto, R. Echeverría, E. Sugai, H. Vazquez, E. Mauriño and J. C. Bai (2001). "Prevalence of celiac disease in Argentina: *Screening* of an adult population in the La Plata area." American Journal of Gastroenterology **96**(9 SUPPL.): 2700-2704.
- Goulet, C., M. Khalf, F. Sainsbury, M. A. D'Aoust and D. Michaud (2012). "A protease activity-depleted environment for heterologous proteins migrating towards the leaf cell apoplast." Plant biotechnology journal **10**(1): 83-94.
- Griffin, M., R. Casadio and C. M. Bergamini (2002). "Transglutaminases: nature's biological glues." Biochemical Journal **368**(2): 377-396.
- Gustafsson, C., J. Minshull, S. Govindarajan, J. Ness, A. Villalobos and M. Welch (2012). "Engineering genes for predictable protein expression." Protein Expr Purif **83**(1): 37-46.
- Harrison, M. D., J. Geijskes, H. D. Coleman, K. Shand, M. Kinkema, A. Palupe, R. Hassall, M. Sainz, R. Lloyd, S. Miles and J. L. Dale (2011). "Accumulation of recombinant cellobiohydrolase and endoglucanase in the leaves of mature transgenic sugar cane." Plant Biotechnology Journal **9**(8): 884-896.
- Harrison, M. D., R. J. Geijskes, R. Lloyd, S. Miles, A. Palupe, M. B. Sainz and J. L. Dale (2014). "Recombinant cellulase accumulation in the leaves of mature, vegetatively propagated transgenic sugarcane." Molecular Biotechnology **56**(9): 795-802.

- Haseloff, J., K. R. Siemering, D. C. Prasher and S. Hodge (1997). "Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(6): 2122-2127.
- Hehle, V. K., R. Lombardi, C. J. van Dolleweerd, M. J. Paul, P. Di Micco, V. Morea, E. Benvenuto, M. Donini and J. K. Ma (2015). "Site-specific proteolytic degradation of IgG monoclonal antibodies expressed in tobacco plants." Plant Biotechnol J **13**(2): 235-245.
- Herman, E. M. and B. A. Larkins (1999). "Protein storage bodies and vacuoles." Plant Cell **11**(4): 601-613.
- Hill, I. D. (2005). "What are the sensitivity and specificity of serologic tests for celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in different populations?" Gastroenterology **128**(4 SUPPL. 1).
- Hofbauer, A., S. Melnik, M. Tschofen, E. Arcalis, H. T. Phan, U. Gresch, J. Lampel, U. Conrad and E. Stoger (2016). "The encapsulation of hemagglutinin in protein bodies achieves a stronger immune response in mice than the soluble antigen." Frontiers in plant science **7**.
- Holtz, B. R., B. R. Berquist, L. D. Bennett, V. J. M. Kommineni, R. K. Muniguntti, E. L. White, D. C. Wilkerson, K.-Y. I. Wong, L. H. Ly and S. Marcel (2015). "Commercial-scale biotherapeutics manufacturing facility for plant-made pharmaceuticals." Plant Biotechnology Journal **13**(8): 1180-1190.
- Hood, E., C. Cramer, G. Medrano and J. Xu (2012). "Protein targeting: strategic planning for optimizing protein products through plant biotechnology." Plant Biotechnology and Agriculture: Prospects for the 21st Century: 35-54.
- Hsieh, K. and A. H. Huang (2004). "Endoplasmic reticulum, oleosins, and oils in seeds and tapetum cells." Plant Physiology **136**(3): 3427-3434.
- Husby, S., S. Koletzko, I. Korponay-Szabo, M. Mearin, A. Phillips, R. Shamir, R. Troncone, K. Giersiepen, D. Branski and C. Catassi (2012). "European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease." Journal of pediatric gastroenterology and nutrition **54**(1): 136-160.
- Jackson, M. A., K. A. Nutt, R. Hassall and A. L. Rae (2010). "Comparative efficiency of subcellular targeting signals for expression of a toxic protein in sugarcane." Functional Plant Biology **37**(8): 785-793.
- Jacquet, N., C. Navarre, D. Desmecht and M. Boutry (2014). "Hydrophobin Fusion of an Influenza Virus Hemagglutinin Allows High Transient Expression in *Nicotiana benthamiana*, Easy Purification and Immune Response with Neutralizing Activity." PLoS one **9**(12): e115944.
- Jha, S., S. Agarwal, I. Sanyal, G. Jain and D. Amla (2012). "Differential subcellular targeting of recombinant human  $\alpha$  1-proteinase inhibitor influences yield, biological activity and in planta stability of the protein in transgenic tomato plants." Plant science **196**: 53-66.
- Joensuu, J. J., K. D. Brown, A. J. Conley, A. Clavijo, R. Menassa and J. E. Brandle (2009). "Expression and purification of an anti-Foot-and-mouth disease virus single chain variable antibody fragment in tobacco plants." Transgenic Research **18**(5): 685-696.
- Joensuu, J. J., A. J. Conley, M. Lienemann, J. E. Brandle, M. B. Linder and R. Menassa (2010). "Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*." Plant Physiol **152**(2): 622-633.
- Joseph, M., M. D. Ludevid, M. Torrent, V. Rofidal, M. Tauzin, M. Rossignol and J. B. Peltier (2012). "Proteomic characterisation of endoplasmic reticulum-derived protein bodies in tobacco leaves." BMC Plant Biol **12**: 36.
- Jutras, P. V., C. Marusic, C. Lonoce, C. Deflers, M. C. Goulet, E. Benvenuto, D. Michaud and M. Donini (2016). "An Accessory Protease Inhibitor to Increase the Yield and Quality of a Tumour-Targeting mAb in *Nicotiana benthamiana* Leaves." PLoS One **11**(11): e0167086.
- Kaiser, J. (2008). "Is the drought over for pharming." Science **320**(5875): 473-475.
- Kanagarajan, S., C. Tolf, A. Lundgren, J. Waldenstrom and P. E. Brodelius (2012). "Transient expression of hemagglutinin antigen from low pathogenic avian influenza A (H7N7) in *Nicotiana benthamiana*." PLoS One **7**(3): e33010.
- Karimi, M., A. Depicker and P. Hilson (2007). "Recombinational cloning with plant gateway vectors." Plant Physiology **145**(4): 1144-1154.
- Khan, I., R. M. Twyman, E. Arcalis and E. Stoger (2012). "Using storage organelles for the accumulation and encapsulation of recombinant proteins." Biotechnology journal **7**(9): 1099-1108.

- Koul, B., R. Yadav, I. Sanyal, S. Sawant, V. Sharma and D. Amla (2012). "Cis-acting motifs in artificially synthesized expression cassette leads to enhanced transgene expression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)." *Plant physiology and biochemistry* **61**: 131-141.
- Kuraishi, C., J. Sakamoto, K. Yamazaki, Y. SUSA, C. KUHARA and T. SOEDA (1997). "Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking." *Journal of Food Science* **62**(3): 488-490.
- Landry, N., B. J. Ward, S. Trepanier, E. Montomoli, M. Le Dargis, G. Lapini and L. Vezina (2010). "Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza." *PLoS ONE* **5**(12).
- Li, Y. (2011). "Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production." *Biotechnology letters* **33**(5): 869-881.
- Liu, W. J., Q. Wu, B. Xu, X. Y. Zhang, X. L. Xia and H. C. Sun (2014). "Single-step purification of recombinant proteins using elastin-like peptide-mediated inverse transition cycling and self-processing module from *Neisseria meningitidis* FrpC." *Protein Expr Purif* **98**: 18-24.
- Llop-Tous, I., M. Ortiz, M. Torrent and M. D. Ludevid (2011). "The expression of a xylanase targeted to ER-protein bodies provides a simple strategy to produce active insoluble enzyme polymers in tobacco plants." *PLoS One* **6**(4): e19474.
- Lojewska, E., T. Kowalczyk, S. Olejniczak and T. Sakowicz (2016). "Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins." *Protein Expr Purif* **120**: 110-117.
- Lombardi, R., P. Circelli, M. E. Villani, G. Buriani, L. Nardi, V. Coppola, L. Bianco, E. Benvenuto, M. Donini and C. Marusic (2009). "High-level HIV-1 Nef transient expression in *Nicotiana benthamiana* using the P19 gene silencing suppressor protein of Artichoke Mottled Crinkle Virus." *BMC Biotechnology* **9**.
- Lombardi, R., M. E. Villani, M. Di Carli, P. Brunetti, E. Benvenuto and M. Donini (2010). "Optimisation of the purification process of a tumour-targeting antibody produced in *N. benthamiana* using vacuum-agroinfiltration." *Transgenic Res* **19**(6): 1083-1097.
- Lomonosoff, G. P. and M. A. D'Aoust (2016). "Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment." *Science* **353**(6305): 1237-1240.
- Lorand, L. and R. M. Graham (2003). "Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions." *Nature reviews Molecular cell biology* **4**(2): 140-156.
- Love, A. J., S. N. Chapman, E. Noris, M. T. S. Matic and G. P. Lomonosoff (2012). "In planta production of a candidate vaccine against bovine papillomavirus type 1." *Planta* **236**: 1305-1313.
- Ma, J. K. C., J. Drossard, D. Lewis, F. Altmann, J. Boyle, P. Christou, T. Cole, P. Dale, C. J. van Dolleweerd, V. Isitt, D. Katinger, M. Lobedan, H. Mertens, M. J. Paul, T. Rademacher, M. Sack, P. A. C. Hundleby, G. Stiegler, E. Stoger, R. M. Twyman, B. Vcelar and R. Fischer (2015). "Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants." *Plant Biotechnology Journal* **13**(8): 1106-1120.
- Mardanava, E. S., R. Y. Kotlyarov, V. V. Kuprianov, L. A. Stepanova, L. M. Tsybalova, G. P. Lomonosoff and N. V. Ravin (2015). "Rapid high-yield expression of a candidate influenza vaccine based on the ectodomain of M2 protein linked to flagellin in plants using viral vectors." *BMC Biotechnol* **15**: 42.
- Marin Viegas, V. S., C. G. Ocampo and S. Petrucci (2016). "Vacuolar deposition of recombinant proteins in plant vegetative organs as a strategy to increase yields." *Bioengineering* **3**.
- Markley, N., C. Nykiforuk, J. Boothe and M. Moloney (2006). "Producing proteins using transgenic oilbody-oleosin technology." *Biopharm international* **19**(6).
- Marty, F. (1999). "Plant vacuoles." *The Plant Cell* **11**(4): 587-599.
- Matic, S., V. Masenga, A. Poli, R. Rinaldi, R. G. Milne, M. Vecchiati and E. Noris (2012). "Comparative analysis of recombinant Human Papillomavirus 8 L1 production in plants by a variety of expression systems and purification methods." *Plant Biotechnol J* **10**(4): 410-421.
- Mauro, V. P. and S. A. Chappell (2014). "A critical analysis of codon optimization in human therapeutics." *Trends in molecular medicine* **20**(11): 604-613.
- McLean, M. D., R. Chen, D. Yu, K.-Z. Mah, J. Teat, H. Wang, S. Zaplachinski, J. Boothe and J. C. Hall (2012). "Purification of the therapeutic antibody trastuzumab from genetically modified plants using safflower Protein A-oleosin oilbody technology." *Transgenic research* **21**(6): 1291-1301.

- Meyer, D. E. and A. Chilkoti (1999). "Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides." *Nature Biotechnology* **17**: 1112-1115.
- Misaki, R., Y. Sakai, T. Omasa, K. Fujiyama and T. Seki (2011). "N-terminal vacuolar sorting signal at the mouse antibody alters the N-linked glycosylation pattern in suspension-cultured tobacco BY2 cells." *Journal of bioscience and bioengineering* **112**(5): 476-484.
- Moloney, M. M. (2002). *Plant molecular farming: using oleosin partitioning technology in oilseeds. Plants as Factories for Protein Production*, Springer: 55-75.
- Mortimer, C. L., B. Dugdale and J. L. Dale (2015). "Updates in inducible transgene expression using viral vectors: From transient to stable expression." *Current Opinion in Biotechnology* **32**: 85-92.
- Mortimer, E., J. M. Maclean, S. Mbewana, A. Buys, A. L. Williamson, I. I. Hitzeroth and E. P. Rybicki (2012). "Setting up a platform for plant-based influenza virus vaccine production in South Africa." *BMC Biotechnology* **12**.
- Nakagawa, T., S. Ishiguro and T. Kimura (2009). "Gateway vectors for plant transformation." *Plant Biotechnology* **26**(3): 275-284.
- Nakagawa, T., T. Suzuki, S. Murata, S. Nakamura, T. Hino, K. Maeo, R. Tabata, T. Kawai, K. Tanaka, Y. Niwa, Y. Watanabe, K. Nakamura, T. Kimura and S. Ishiguro (2007). "Improved gateway binary vectors: High-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **71**(8): 2095-2100.
- Nausch, H., H. Mischofsky, R. Koslowski, U. Meyer, I. Broer and J. Huckauf (2012). "Expression and Subcellular Targeting of Human Complement Factor C5a in Nicotiana species." *PLoS ONE* **7**(12).
- Nelson, B. K., X. Cai and A. Nebenfuhr (2007). "A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants." *Plant Journal* **51**(6): 1126-1136.
- Ocampo, C. G., J. F. Lareu, V. S. Marin Viegas, S. Mangano, A. Loos, H. Steinkellner and S. Petrucci (2016). "Vacuolar targeting of recombinant antibodies in Nicotiana benthamiana." *Plant Biotechnology Journal* **14**(12): 2265-2275.
- Ocmant, A. and F. Mascart (2007). "Effective Detection of Celiac Disease Using Salivary Anti-transglutaminase." *American Journal of Medicine* **120**(10).
- Osman, A. A., T. Richter, M. Stern, K. Conrad, J. Henker, C. Brandsch, K. P. Zimmer and T. Mothes (2002). "Production of recombinant human tissue transglutaminase using the baculovirus expression system, and its application for serological diagnosis of coeliac disease." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **14**(11): 1217-1223.
- Özrenk, E. (2006). "The use of transglutaminase in dairy products." *International Journal of Dairy Technology* **59**(1): 1-7.
- Pagny, S., M. Cabanes-Macheteau, J. W. Gillikin, N. Leborgne-Castel, P. Lerouge, R. S. Boston, L. Faye and V. Gomord (2000). "Protein recycling from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in plants and its minor contribution to calreticulin retention." *The Plant Cell* **12**(5): 739-755.
- Patron, N. J., D. Orzaez, S. Marillonnet, H. Warzecha, C. Matthewman, M. Youles, O. Raitskin, A. Leveau, G. FarrÃ©, C. Rogers, A. Smith, J. Hibberd, A. A. R. Webb, J. Locke, S. Schornack, J. Ajioka, D. C. Baulcombe, C. Zipfel, S. Kamoun, J. D. G. Jones, H. Kuhn, S. Robatzek, H. P. Van Esse, D. Sanders, G. Oldroyd, C. Martin, R. Field, S. O'Connor, S. Fox, B. Wulff, B. Miller, A. Breakspear, G. Radhakrishnan, P. M. Delaux, D. LoquÃ©, A. Granell, A. Tissier, P. Shih, T. P. Brutnell, W. P. Quick, H. Rischer, P. D. Fraser, A. Aharoni, C. Raines, P. F. South, J. M. AnÃ©, B. R. Hamberger, J. Langdale, J. Stougaard, H. Bouwmeester, M. Udvardi, J. A. H. Murray, V. Ntoukakis, P. SchÃ¶fer, K. Denby, K. J. Edwards, A. Osbourn and J. Haseloff (2015). "Standards for plant synthetic biology: A common syntax for exchange of DNA parts." *New Phytologist* **208**(1): 13-19.
- Paul, M. J., H. Thangaraj and J. K. Ma (2015). "Commercialization of new biotechnology: a systematic review of 16 commercial case studies in a novel manufacturing sector." *Plant Biotechnol J* **13**(8): 1209-1220.
- Paul, M. J., H. Thangaraj and J. K. C. Ma (2015). "Commercialization of new biotechnology: A systematic review of 16 commercial case studies in a novel manufacturing sector." *Plant Biotechnology Journal* **13**(8): 1209-1220.
- PÃ©rez Aguirreburualde, M. S., S. Petrucci, F. Bravo Almonacid and A. Wigdorovitz (2016). "Plant-Based Vaccine for Livestock: Key Points to Unleash Platform Translation in Developing Countries." *Current Molecular Biology Reports*: 1-9.

- Petrucelli, S., M. I. Molina, F. J. Lareu and A. Circosta (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**(6-7): 400-409.
- Petrucelli, S., M. S. Otegui, F. Lareu, O. Tran Dinh, A. C. Fichette, A. Circosta, M. Rumbo, M. Bardor, R. Carcamo, V. Gomord and R. N. Beachy (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**(5): 511-527.
- Peyret, H. and G. P. Lomonosoff (2015). "When plant virology met *Agrobacterium*: The rise of the deconstructed clones." *Plant Biotechnology Journal* **13**(8): 1121-1135.
- Phan, H. T. and U. Conrad (2011). "Membrane-based inverse transition cycling: an improved means for purifying plant-derived recombinant protein-elastin-like polypeptide fusions." *Int J Mol Sci* **12**(5): 2808-2821.
- Phan, H. T., B. Hause, G. Hause, E. Arcalis, E. Stoger, D. Maresch, F. Altmann, J. Joensuu and U. Conrad (2014). "Influence of elastin-like polypeptide and hydrophobin on recombinant hemagglutinin accumulations in transgenic tobacco plants." *PLoS One* **9**(6): e99347.
- Phan, H. T., J. Pohl, D. M. Floss, F. Rabenstein, J. Veits, B. T. Le, H. H. Chu, G. Hause, T. Mettenleiter and U. Conrad (2013). "ELPylated haemagglutinins produced in tobacco plants induce potentially neutralizing antibodies against H5N1 viruses in mice." *Plant Biotechnology Journal* **11**(5): 582-593.
- 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." *Clin Vaccine Immunol* **13**(1): 150-151.
- Qiu, X., G. Wong, J. Audet, A. Bello, L. Fernando, J. B. Alimonti, H. Fausther-Bovendo, H. Wei, J. Aviles, E. Hiatt, A. Johnson, J. Morton, K. Swope, O. Bohorov, N. Bohorova, C. Goodman, D. Kim, M. H. Pauly, J. Velasco, J. Pettitt, G. G. Olinger, K. Whaley, B. Xu, J. E. Strong, L. Zeitlin and G. P. Kobinger (2014). "Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp." *Nature* **514**(7520): 47-53.
- Restrepo, M. A., D. D. Freed and J. C. Carrington (1990). "Nuclear transport of plant potyviral proteins." *The Plant Cell* **2**(10): 987-998.
- Rewers, M. (2005). "Epidemiology of celiac disease: what are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease." *Gastroenterology* **128**(S47-51).
- Robert, S., P. V. Jutras, M. Khalf, M.-A. D'Aoust, M.-C. Goulet, F. Sainsbury and D. Michaud (2016). "Companion protease inhibitors for the in situ protection of recombinant proteins in plants." *Recombinant Proteins from Plants: Methods and Protocols*: 115-126.
- Rostom, A., J. A. Murray and M. F. Kagnoff (2006). "American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease." *Gastroenterology* **131**(6): 1981-2002.
- Rubio-Tapia, A., R. A. Kyle, E. L. Kaplan, D. R. Johnson, W. Page, F. Erdtmann, T. L. Brantner, W. R. Kim, T. K. Phelps and B. D. Lahr (2009). "Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease." *Gastroenterology* **137**(1): 88-93.
- Saberianfar, R., J. J. Joensuu, A. J. Conley and R. Menassa (2015). "Protein body formation in leaves of *Nicotiana benthamiana*: a concentration-dependent mechanism influenced by the presence of fusion tags." *Plant Biotechnol J* **13**(7): 927-937.
- Sack, M., T. Rademacher, H. Spiegel, A. Boes, S. Hellwig, J. Drossard, E. Stoger and R. Fischer (2015). "From gene to harvest: insights into upstream process development for the GMP production of a monoclonal antibody in transgenic tobacco plants." *Plant Biotechnol J* **13**(8): 1094-1105.
- Sainsbury, F., M. Sack, J. Stadlmann, H. Quendler, R. Fischer and G. P. Lomonosoff (2010). "Rapid transient production in plants by replicating and non-replicating vectors yields high quality functional anti-HIV antibody." *PLoS One* **5**(11): e13976.
- Sainsbury, F., M. Sack, J. Stadlmann, H. Quendler, R. Fischer and G. P. Lomonosoff (2011). "Rapid transient production in plants by replicating and non-replicating vectors yields high quality functional anti-HIV antibody." *PLoS ONE* **5**(11).
- Sainsbury, F., E. C. Thuenemann and G. P. Lomonosoff (2009). "PEAQ: Versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants." *Plant Biotechnology Journal* **7**(7): 682-693.
- Sárdy, M., U. Odenthal, S. Kárpáti, M. Paulsson and N. Smyth (1999). "Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy." *Clinical chemistry* **45**(12): 2142-2149.

- Sarrion-Perdigones, A., E. E. Falconi, S. I. Zandalinas, P. Juárez, A. Fernández-del-Carmen, A. Granell and D. Orzaez (2011). "GoldenBraid: An iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules." *PLoS ONE* **6**(7).
- Saxena, P., E. C. Thuenemann, F. Sainsbury and G. P. Lomonossoff (2016). "Virus-Derived Vectors for the Expression of Multiple Proteins in Plants." *Methods Mol Biol* **1385**: 39-54.
- Scabone, C. M. (2012). Estudio de señales derivadas de receptores de direccionamiento vacuolar y su aplicación en la expresión de un anticuerpo monoclonal de utilidad en diagnóstico. Tesis de Doctorado, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Scabone, C. M., L. Frigerio and S. Petruccelli (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 Rep.*
- Schillberg, S., N. Emans and R. Fischer (2002). "Antibody molecular farming in plants and plant cells." *Phytochemistry Reviews* **1**(1): 45-54.
- Schouten, A., J. Roosien, F. van Engelen, G. de Jong, A. Borst-Vremsen, J. Zilverentant, D. Bosch, W. Stiekema, F. Gommers, A. Schots and J. Bakker (1996). "The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco." *Plant Mol Biol* **30**(4): 781-793.
- Shaaltiel, Y., D. Bartfeld, S. Hashmueli, G. Baum, E. Brill-Almon, G. Galili, O. Dym, S. A. Boldin-Adamsky, I. Silman, J. L. Sussman, A. H. Futerman and D. Aviezer (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**(5): 579-590.
- Shaaltiel, Y., Hashmueli, S., Bartfeld, D., Baum, G., Ratz, T., Mizrahi, E., (2006). "System and Method for Production of Antibodies in Plant Cell Culture. ." *Patent No. 20090082548 A1*.
- Shah, K. H., B. Almaghrabi and H. Bohlmann (2013). "Comparison of Expression Vectors for Transient Expression of Recombinant Proteins in Plants." *Plant Molecular Biology Reporter* **31**(6): 1529-1538.
- Shi, Q., S.-Y. Kim, J. P. Blass and A. J. Cooper (2002). "Expression in *Escherichia coli* and purification of hexahistidine-tagged human tissue transglutaminase." *Protein expression and purification* **24**(3): 366-373.
- Smits, F. C. M., B. C. Buddingh, M. B. Van Eldijk and J. C. M. Van Hest (2015). "Elastin-like polypeptide based nanoparticles: Design rationale toward nanomedicine." *Macromolecular Bioscience* **15**(1): 36-51.
- Sorell Gómez, L. T. and B. E. Acevedo Castro (2005). Assay for anti transglutaminase antibodies detection useful in celiac disease diagnosis. **US 6905835**.
- Sorrentino, A., S. Schillberg, R. Fischer, R. Porta and L. Mariniello (2009). "Molecular farming of human tissue transglutaminase in tobacco plants." *Amino Acids* **36**(4): 765-772.
- Sorrentino, A., S. Schillberg, R. Fischer, R. Rao, R. Porta and L. Mariniello (2005). "Recombinant human tissue transglutaminase produced into tobacco suspension cell cultures is active and recognizes autoantibodies in the serum of coeliac patients." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**(4): 842-851.
- Stein, H., M. Wilensky, Y. Tsafrir, M. Rosenthal, R. Amir, T. Avraham, K. Ofir, O. Dgany, A. Yayon and O. Shoseyov (2009). "Production of bioactive, post-translationally modified, heterotrimeric, human recombinant type-I collagen in transgenic tobacco." *Biomacromolecules* **10**(9): 2640-2645.
- Stenberg, P., E. B. Roth and K. Sjöberg (2008). "Transglutaminase and the pathogenesis of coeliac disease." *Eur J Intern Med* **19**(2): 83-91.
- Stoger, E., J. K. Ma, R. Fischer and P. Christou (2005). "Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants." *Curr Opin Biotechnol* **16**(2): 167-173.
- Streatfield, S. J., N. Kushnir and V. Yusibov (2015). "Plant-produced candidate countermeasures against emerging and reemerging infections and bioterror agents." *Plant Biotechnology Journal* **13**(8): 1136-1159.
- Sulkanen, S., T. Halttunen, K. Laurila, K. L. Kolho, I. R. Korponay-Szabo, A. Sarnesto, E. Savilahti, P. Collin and M. Maki (1998). "Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease." *Gastroenterology* **115**(6): 1322-1328.
- Tekoah, Y., A. Shulman, T. Kizhner, I. Ruderfer, L. Fux, Y. Nataf, D. Bartfeld, T. Ariel, S. Gingis-Velitski, U. Hanania and Y. Shaaltiel (2015). "Large-scale production of pharmaceutical

- proteins in plant cell culture-the protalix experience." Plant Biotechnology Journal **13**(8): 1199-1208.
- Tian, L. and S. S. Sun (2011). "A cost-effective ELP-intein coupling system for recombinant protein purification from plant production platform." PLoS One **6**(8): e24183.
- Torrent, M., I. Llop-Tous and M. D. Ludevid (2009). "Protein body induction: a new tool to produce and recover recombinant proteins in plants." Recombinant Proteins From Plants: Methods and Protocols: 193-208.
- Tschofen, M., D. Knopp, E. Hood and E. Stoger (2016). "Plant Molecular Farming: Much More than Medicines." Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif) **9**(1): 271-294.
- Tusé, D., N. Ku, M. Bendandi, C. Becerra, R. Collins, N. Langford, S. I. Sancho, A. López-Díaz De Cerio, F. Pastor, R. Kandzia, F. Thieme, F. Jarczowski, D. Krause, J. K. C. Ma, S. Pandya, V. Klimyuk, Y. Gleba and J. E. Butler-Ransohoff (2015). "Clinical safety and immunogenicity of tumor-targeted, plant-made id-klh conjugate vaccines for follicular lymphoma." BioMed Research International **2015**.
- Ullrich, K. K., M. Hiss and S. A. Rensing (2015). "Means to optimize protein expression in transgenic plants." Current Opinion in Biotechnology **32**: 61-67.
- Urry, D. W. (1992). "Free energy transduction in polypeptides and proteins based on inverse temperature transitions." Progress in Biophysics and Molecular Biology **57**(1): 23-57.
- Urry, D. W., D. CHANNE GOWDA, TIMOTHY M. PARKER, CHI-HAO LUAN, MICHAEL C. REID, CYNTHIA M. HARRIS, ASIMA PATTANAIK and R. D. HARRIS (1992). "Hydrophobicity Scale for Proteins Based on Inverse Temperature Transitions." Biopolymers **32**: 1243-1250.
- Urry, D. W., A. Pattanaik, J. Xu, T. Cooper Woods, D. T. McPherson and T. M. Parker (1998). "Elastic protein-based polymers in soft tissue augmentation and generation." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **9**(10): 1015-1048.
- Van Heel, D. A. and J. West (2006). "Recent advances in coeliac disease." Gut **55**(7): 1037-1046.
- Vermij, P. (2006). "News In Brief: USDA approves the first plant-based vaccine. ." Nature Biotechnology **24**: 233-234.
- Vezina, L. P., L. Faye, P. Lerouge, M. A. D'Aoust, E. Marquet-Blouin, C. Burel, P. O. Lavoie, M. Bardor and V. Gomord (2009). "Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants." Plant Biotechnology Journal **7**(5): 442-455.
- Voinnet, O., S. Rivas, P. Mestre and D. Baulcombe (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**(5): 949-956.
- Wandelt, C. I., M. R. I. Khan, S. Craig, H. E. Schroeder, D. Spencer, T. J. V. Higgins and C. I. Wandelt (1992). "Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants." Plant Journal **2**(2): 181-192.
- Weintraub, J. A., J. F. Hilton, J. M. White, C. I. Hoover, K. L. Wycoff, L. Yu, J. W. Larrick and J. D. B. Featherstone (2005). "Clinical trial of a plant-derived antibody on recolonization of mutans streptococci." Caries Research **39**(3): 241-250.
- Whitehead, M., P. Öhlschläger, F. N. Almajhdi, L. Alloza, P. Marzábal, A. E. Meyers, I. I. Hitzeroth and E. P. Rybicki (2014). "Human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein bodies cause tumour regression in mice." BMC cancer **14**(1): 367.
- Yang, J., L. A. Barr, S. R. Fahnestock and Z.-B. Liu (2005). "High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting." Transgenic research **14**(3): 313-324.
- Yang, K., Y. Su, J. Li, J. Sun and Y. Yang (2012). "Expression and purification of the antimicrobial peptide cecropin AD by fusion with cationic elastin-like polypeptides." Protein expression and purification **85**(2): 200-203.
- Zintzaras, E. and A. E. Germeis (2006). "Performance of antibodies against tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease: Meta-analysis." Clinical and Vaccine Immunology **13**(2): 187-192.