

Tesis doctoral

“Estudio del transporte de proteínas heterólogas a vacuolas en células vegetales y del impacto del gen LEC2 en su acumulación y modificación”

Tesista: Carolina Gabriela Ocampo

Directora: Silvana Petruccelli

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Trabajo de Tesis Doctoral:

Estudio del transporte de proteínas heterólogas a vacuolas en células vegetales y del impacto del gen LEC2 en su acumulación y modificación

Tesista: Ocampo Carolina Gabriela

Directora: Petruceli Silvana

Año: 2019

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 intergrantes y ex-integrantes del labo: Coqui (hermosa persona que lleno de alegría al laboratorio), Fla, Vane y Fer, por todos los momentos vividos, relacionados y ajenos al laboratorio, por las charlas y los mates.

A Flor, Pi y Mati, hermosas personas que encontré en el CIDCA, gracias por el apoyo, las charlas y la locura compartida.

A mis amigas de la facu: Kari, Aldi y Fio, por muchos años de amistad y charlas, aunque no siempre nos encontremos sé que son incondicionales.

A Aye, mi querida amiga, a pesar de ser tan distintas y lo difícil que resulta a veces vernos sos un gran sostén!

A mi mamá, una gran mujer y madre! Sos una persona maravillosa. Gracias por tu apoyo incondicional, por criarnos con tanto amor y esmero y empujarnos a ser cada vez mejores.

A mi hermana Meli, por ser tan especial, con su forma tan única de ver la vida y ponerle ganas. Te adoro! Gracias por ser parte de mi vida.

A Bruno, mi novio. Por el apoyo, por el día a día, por elegirnos. Gracias!

A todos, muchas gracias!

Publicaciones del presente trabajo

PUBLICACIONES EN REVISTAR CIENTÍFICAS

Artículos publicados en revistas internacionales con referato en relación a 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.
- Marin Viegas, V.S*., **Ocampo, C.G***. 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. *Los autores contribuyeron en partes iguales.
- **Ocampo, C.G.**; Petruccelli, S. Vacuolar Targeting and Characterization of Recombinant Antibodies (2018). *Methods in Molecular Biology*. 1789:65-80. doi: 10.1007/978-1-4939-7856-4_6.

Capítulos en libros sin referato en relación a esta tesis:

- **Ocampo, C. G.** Modificaciones post-traduccionales de proteínas foráneas producidas en células vegetales y estrategias de ingeniería. En: “Las plataformas de producción de proteínas basadas en plantas”, editado por Silvana Petruccelli, publicado por Editorial Academia Española. ISBN: 978-620-2-23975-2.

PARTICIPACIÓN EN REUNIONES CIENTÍFICAS

Comunicaciones como póster:

“Expresión de anticuerpos completos dirigidos a distintos compartimentos de la vía secretoria en hojas de *Nicotiana bethamiana* y estudio de su glicosilación.” Ocampo Carolina Gabriela, Lareu Fabricio, Petruccelli Silvana. XII Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial, Argentina, 2015.

“Transport and deposition of vacuolar antibodies in *Nicotiana benthamiana* leaves.” Ocampo Carolina Gabriela, Lareu Fabricio, Petruccelli Silvana. 11th International Congress of Plant Molecular Biology, Brasil, 2015.

“Fluorescent Imaging of ER Protein Bodies Induced by Elastin Like Protein Expression in *Nicotiana benthamiana* Leaves.” Ocampo Carolina Gabriela, Marin Viegas Vanesa, Mazzini Flavia, Petruccelli Silvana. *Imaging Techniques for Biotechnological and Biomedical Applications*. Argentina, 2016.

Comunicaciones orales:

“Transient expression of vacuolar antibodies and human transglutaminase in *N. benthamiana* leaves “Agricultural Biotechnology in the XXI Century”. Carolina Gabriela Ocampo, Vanesa Soledad Marin Viegas, Flavia Noelia Mazzini, Silvana Petrucelli. Cuba, 2017.

Índice

Agradecimientos	i
Publicaciones del presente trabajo	ii
Índice	v
Abreviaturas	ix
Introducción	1
1. Las plantas como sistema de expresión.....	2
1.1. Ventajas de las plantas como sistema de expresión	2
1.1.1 Versatilidad y simplicidad de transformación	2
1.1.2 Bioseguridad y autenticidad del producto	5
1.1.3 Costos de producción.....	5
1.2. Las plantas como biorreactores para la producción de anticuerpos	7
1.3 Estructura, síntesis y función de inmunoglobulinas	8
1.4. Situación actual de los sistemas de expresión basados en plantas	13
2. Estrategias empleadas para mejorar los niveles de acumulación de proteínas recombinantes en plantas	19
2.1. Velocidad de la transcripción	21
2.2. Estabilidad y transporte del mRNA	21
2.3. Velocidad de la traducción	22
2.4. Estabilidad proteica.....	22
3. Modificaciones post-traduccionales en plantas.....	23
3.1. Plegamiento oxidativo.....	24
3.2. N-Glicosilación	25
4. La vía secretoria en plantas	28
4.1. Transporte de proteínas en la vía secretoria	31
4.1.1. Transporte de proteínas a la vacuola por la via dependiente del GA	33
4.1.2. Vía de transporte de proteínas a vacuola independientes del GA.....	34
5. subfamilia de factores de transcripción AFL	36
Hipótesis y Objetivo	43
Capítulo I: Direccionamiento vacuolar de anticuerpos recombinantes en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	48
1. Introducción.....	49
2. Resultados.....	52

2.1.	Expresión transitoria de las variantes del mAb 14D9 en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	52
2.2.	Patrón de glicosilación del mAb14D9	55
2.3.	Localización subcelular de las diferentes versiones del anticuerpo 14D9	57
3.	Discusión	63
Capítulo II: Impacto de la sobreexpresión del gen LEC2 (<i>Leafy cotyledon 2</i>) en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>		69
1.	Introducción.....	70
2.	Resultados.....	72
2.1.	Expresión transitoria del gen LEC2 de <i>Arabidopsis thaliana</i> en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	72
2.2.	Diseño experimental	74
2.3.	Efecto de LEC2 sobre los niveles de acumulación de proteínas reporteras.....	76
2.4.	Efectos de LEC2 sobre marcadores de la vía secretoria	77
2.5.	Análisis del efecto estabilizante de LEC2	80
2.6.	Efecto de LEC2 sobre los rendimientos y rutas de transporte seguida por las diferentes variantes del mAb 14D9	82
2.6.1.	Localización subcelular	82
2.6.2.	Glicosilación de las diferentes variantes de los mAbs	84
2.6.3.	Niveles de acumulación de las diferentes variantes del mAb14D9	87
3.	Discusión.....	88
Conclusiones		99
Materiales y Métodos		103
1.	Materiales	104
1.1.	Material biológico	104
1.1.1.	Cepas bacterianas	104
1.1.2.	Plantas	104
1.2.	Medios y soluciones	105
1.2.1.	Medios de cultivos para bacterias	105
1.2.2.	Soluciones	105
1.3.	Soluciones de antibióticos	106
1.4.	Reactivos.....	106
1.5.	Vectores plasmídicos.....	107
1.5.1.	Plásmidos comerciales	107
1.5.2.	Plásmidos disponibles en nuestro laboratorio	107
1.5.3.	Plásmidos cedidos por otros laboratorios.....	108
1.5.4.	Plásmidos adquiridos comercialmente del <i>Arabidopsis Stock Center</i>	108

1.6.	Enzimas y kits enzimáticos.....	108
1.7.	Herramientas informáticas.....	108
1.8.	Anticuerpos.....	109
2.	Metodologías.....	111
2.1.	Minipreparación de DNA plasmídico.....	111
2.2.	Digestiones enzimáticas.....	111
2.3.	Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	111
2.4.	Purificación de DNA a partir de gel de agarosa y utilizando kit comercial.....	112
2.5.	Recombinación sitio específica mediante el sistema Gateway (LR clonasa).....	112
2.6.	Preparación de células competentes químicas de <i>E. coli</i> DH5- α y TOP10.....	112
2.7.	Transformación química de células competentes de <i>E. coli</i> DH5- α y TOP10.....	113
2.8.	Preparación de células electrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i> GV3101.....	113
2.9.	Transformación de células electrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i> GV3101.....	114
2.10.	Agroinfiltración de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	114
2.11.	Extracción de proteínas en hojas de plantas.....	115
2.12.	Extracción y purificación de anticuerpos.....	116
2.13.	Cuantificación de proteínas.....	117
2.14.	Medida de actividad proteolítica por el método de la azocaseína.....	117
2.15.	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	117
2.16.	Inmunoensayo.....	118
2.17.	Stripping.....	119
2.18.	Procesamiento de datos por densitometría del inmunoblot.....	119
2.19.	Análisis por MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry).....	119
2.20.	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	120
2.20.1.	ELISA tipo sándwich.....	120
2.20.2.	ELISA indirecto.....	121
2.21.	Aislamiento de membranas microsomales.....	121
2.22.	Agroinfiltración de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	122
2.23.	Obtención y análisis de fluido apoplástico (FA) de hojas.....	122
2.24.	Microscopía de disección fluorescente y microscopía de fluorescencia confocal.....	123
2.25.	Determinación del pH apoplástico foliar.....	124
2.25.1	Determinación del pH del apoplasto de hojas <i>in vivo</i> por microscopia de fluorescencia.....	124
2.25.2	Calibración <i>in vitro</i> del sensor.....	124
2.26.	Análisis estadístico.....	125

Bibliografía	127
Anexo	145
Material suplementario del capítulo II.....	146
1. Efecto de LEC2 sobre reporteros direccionados a vacuolas.....	146
2. Efecto de LEC2 sobre la localización de las variantes vacuolares de GFP.....	147
3. Curva de calibración <i>in vitro</i> del sensor apo-pHusion.....	148

Abreviaturas

$\alpha(1,3)$ -FucT	$\alpha(1,3)$ -Fucosiltransferasa
$\alpha(1,4)$ -FucT	$\alpha(1,4)$ -Fucosiltransferasa
$\alpha(1,6)$ -FucT	$\alpha(1,6)$ -Fucosiltransferasa
$\beta(1,2)$ -XylT	$\beta(1,2)$ -Xilosiltransferasa
35SCaMV	Promotor 35S del virus del mosaico del Coliflor
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	Ácido absícico
ABI3	<i>Absicic Acid Insensitive 3</i>
ADCC	Citotoxicidad dependiente de células
AGL15	AGAMOUS15
AIP	Proteína de interacción con ABI3
Amp	Ampicilina
ARF10	Factor de respuesta a auxina 10
Asn	Asparagina
BR	Brasinoesteroide
CaMV35S	Promotor del RNA 35s del virus del mosaico de coliflor
CAPEX	Gastos de capital
CCV	Vesículas recubiertas de clatrina
CH	Dominio constante de la cadena pesada
CHO	Células de ovario de hámster chino
CK	Citoquinina
CL	Dominio constante de la cadena liviana
CLSM	Microscopio Láser Confocal espectral
COAR	Co-activador/ Co-represor
COGS	Costos de bienes vendidos
COP	Complejo de proteínas de cubierta
ctVSS	Señal de Direccionamiento Vacuolar C-terminal
CV	Vacuola central
Cys	Cisteína
DCAC	Citotoxicidad dependiente de complemento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DV	Vesícula densa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EE	Endosoma temprano
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ELP	Proteína similar a la elastina
ER	Retículo Endoplásmico
ERAD	Degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico
ERES	Sitios de exportación del ER
ERO1	Oxidoreduccina 1 del ER
FA	Fluido apoplástico
Fab	Fragmento de unión al antígeno
Fc	Fragmento cristalizable

FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FLA	Fluido de lavado apopástico
Fv	Fragmento variable
FUS3	<i>FUSCA3</i>
GA	Aparato de Golgi
GA	Ácido giberélico
GCSI y -II	Glucosidasa I y II
GFP	Proteína fluorescente verde
GnTI, -II, -IV y -V	N-acetilglucosamiltransferasa-I, -II, -IV y -V
HC	Cadena pesada
HDCA	Complejo histona desacetilasa
HRP	Peroxidasa de rábano
HSD1	Hidroesteroide deshidrogenasa 1
HSP	Proteína de shock térmico
htTG	Transglutaminasa tisular humana
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina Gamma
JA	Ácido jasmónico
Kan	kanamicina
KDa	kilo-dalton
KDEL	Señal de retención en el retículo endoplasmático
LC	Cadena liviana
LEA	Proteínas abundantes de embriogénesis tardía
LEC1	<i>Leafy Cotyledon 1</i>
LEC2	<i>Leafy Cotyledon 2</i>
LV	Vacuola lítica
mAbs	Anticuerpos monoclonales
ManI y -II	Manosidasa del Golgi I y II
MF	Molecular farming
MI	Medio de infiltración
MP	Pellet microsomal
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MVB	Cuerpo multivesicular
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
ON	Durante la noche (overnight)
PA	Pro-antocianina
PAC	Vesículas acumuladoras de precursores
PBs	Cuerpos proteicos
PBS	<i>Buffer</i> de fosfato salino
PBP	Plataformas basadas en plantas
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PHB	PHABULOSA
PHV	PHAVOLUTA
pIgR	Receptor polimérico de Ig
PM	Peso molecular
PMP	Proteínas/ farmacéuticos producidos en plantas
PPIasa	Peptidil proil-isomerasa
PRC	<i>Polycron Repressive Complex</i>

Pro	Prolina
PSV	Vacuola de Almacenamiento de Proteínas
PTGS	Silenciamiento génico post-transcripcional
PTM	Modificación post-transcripcional
PVC	Compartimento prevacuolar
RFP	Proteína Roja Fluorescente monomérica
RMR	Receptor de membrana Ring-H2
SC	Componente secretorio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturalizante
SF	Fracción soluble
SiaT	$\alpha(2,6)$ -sialiltransferasa
SOM	SOMNUS
SP	Péptido Señal
SSP	Proteína de reserva de semilla
ssVSS	Señal de Direccionamiento Vacuolar
SV	Vesícula secretoria
TAG	Triacilglicerol
TEA	Análisis tecnoeconómico
Tet	Tetraciclina
TGN	Red trans-Golgi
TIP	Proteína intrínseca de tonoplasto
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
TSP	Proteína Total soluble
TT2	<i>Transparent Testa 2</i>
TTG1	<i>Transparent Testa Glabra 1</i>
UTR	Regiones no traducidas
VH	Dominio variable de la cadena pesada
VL	Dominio variable de la cadena liviana
VSR	Receptor de direccionamiento vacuolar
VSS	Señales de Direccionamiento Vacuolar
WRI1	WRINKLED2
WT	Wild type
YUC2/4	<i>Flavin monoxygenase-like 2/4</i>

Introducción

1. Las plantas como sistema de expresión

El término molecular farming (MF) se refiere a la utilización de plantas o animales para fabricar moléculas heterólogas o foráneas. La palabra farming indica el uso de cultivos agrícolas o animales domésticos como sistema de expresión, mientras que las moléculas foráneas son generalmente proteínas con aplicaciones terapéuticas o industriales. En el caso de moléculas farmacéuticas se suele reemplazar la f de “farming” por “ph” generando la palabra pharming lo cual hace referencia al termino en inglés "*pharmaceutical*" para denominar los productos biológicos. Al emplearse plantas como biorreactores se utiliza la denominación PMP por "*Plant Made Pharmaceuticals*", pudiéndose utilizar la denominación PMP (*Plant Made Proteins*) para la producción de cualquier proteína (Maksimenko y col 2013).

1.1. Ventajas de las plantas como sistema de expresión

Las plataformas basadas en plantas (PBP) ofrecen ventajas sobre las tecnologías que emplean bacterias, levaduras o células de mamífero como biorreactores. En esta sección se describirán las principales características que vuelven a las plantas un sistema prometedor para la producción de moléculas heterólogas.

1.1.1 Versatilidad y simplicidad de transformación

Una de las grandes ventajas que ofrecen los organismos vegetales para la expresión de una proteína heteróloga es la gran variabilidad de posibilidades de transformación, expresión y producción. Los avances en las tecnologías de ingeniería molecular de plantas han permitido que exista una amplia diversidad de plataformas de producción en plantas, las cuales pueden ser clasificadas en: (1) sistemas de cultivo *in vitro*, los cuales incluyen células en suspensión y cultivo de raíces; (2) plantas acuáticas, como musgos y algas; y (3) plantas enteras terrestres, utilizando expresión estable o transitoria (Xu y col 2016). En el último caso las especies más utilizadas son aquellas utilizadas en la industria agrícola debido el amplio conocimiento que existe sobre las mismas y el perfeccionamiento que han alcanzado a lo largo de la historia las técnicas y herramientas utilizadas para su cultivo.

La utilización de plataformas de producción basadas en plantas ofrece una amplia variedad de posibilidades, ya que el uso de cultivos celulares en biorreactores

permite la secreción de la proteína de interés al medio extracelular, mientras que en plantas enteras es posible limitar la expresión a determinados órganos o tejidos como las hojas o la semilla, la elección del mismo dependerá de cuestiones como las modificaciones post-traduccionales (PTMs) necesarias para que el producto sea funcional, la estabilidad de la proteína foránea en ese tejido y los niveles de acumulación deseados (Xu y col 2016, Xu y col 2012).

La expresión en semillas se debe a su naturaleza de órgano de almacenamiento lo que proporciona facilidad de almacenamiento y estabilidad en el tiempo. En este órgano, el producto de interés se encuentra protegido de posibles eventos de degradación y a su vez, se obtienen altos rendimientos de producción (Xu y col 2016). Las semillas más utilizadas hasta el momento han sido las de maíz, arroz, cebada y soja debido a que son especies que generan una gran cantidad de biomasa por unidad de área sembrada y tienen un alto contenido proteico (Sabalza y col 2013).

La expresión en hojas y raíces se utiliza en la producción de proteínas heterólogas, aprovechando la generación de grandes cantidades de biomasa y la posibilidad de rizosecreción, respectivamente (Xu y col 2016). El tabaco es la especie vegetal más utilizada para la expresión de proteínas en hojas debido al alto rendimiento de biomasa y a que los procedimientos de transformación y expresión en esta especie han sido ya bien establecidos. Además, el tabaco no es de consumo humano como comestible por lo que no existe riesgo de perturbar la cadena alimentaria. Sin embargo, esta especie tiene un alto contenido de alcaloides que pueden resultar tóxicos y sus células producen estructuras de glicosilación heterogéneas que pueden afectar la funcionalidad y aplicabilidad de la proteína de interés. Otras especies cuyas hojas son de uso popular para la expresión de proteínas heterólogas son la alfalfa, la espinaca y la lechuga (Bhatia y Dahiya, 2015, Xu y col 2012).

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

En la transformación estable, el ADN se integra en el genoma de la célula y luego a partir de las células transformadas se regenera la planta o bien las células

transformadas se multiplican por cultivos *in vitro*. El gen exógeno se introduce en el genoma del núcleo o del cloroplasto de la planta y es transmitido de una generación a la otra. La estrategia de transformación nuclear permite sintetizar las proteínas de interés en diferentes órganos y tejidos con un procesamiento típico de células eucariotas. El inconveniente es que involucra largos ciclos de producción en algunos cultivos, además del riesgo de intercambio genético entre especies nativas o de alimentación. A su vez, los periodos de tiempo necesarios para alcanzar la escala comercial son largos debido a la regulación que poseen los cultivos transgénicos (Sparrow y Twyman, 2009). La transformación de cloroplastos es un sistema prometedor cuando la proteína de interés no requiere modificaciones post-traduccionales complejas (Morgenfeld y col 2014, Daniell y col 2005). La transformación transitoria era usada para verificar la funcionalidad de una construcción y validar pequeñas cantidades de proteína recombinante. Sin embargo, esta técnica ha sido mejorada y actualmente es fácilmente escalable (Tusé, 2011). En estos sistemas los genes llegan al núcleo, pero no se integran al genoma, por lo cual se expresan por un tiempo limitado hasta perderse.

Los métodos utilizados para transformar células vegetales son principalmente dos: biobalística y transformación indirecta mediada por *Agrobacterium sp.* La biobalística es utilizada para transformación estable de monocotiledóneas y cloroplastos o para expresión temporal en distintos tejidos. En esta técnica se utilizan micropartículas de oro o tungsteno, las cuales están cubiertas con el plásmido que porta el gen de interés, que son aceleradas para penetrar la célula utilizando una pistola génica (Baltes y col 2017). Las células transformadas son seleccionadas empleando un marcador de selección. Los métodos indirectos hacen uso de la maquinaria de transferencia de genes que poseen las agrobacterias para introducir el ADN dentro de la célula vegetal. *Agrobacterium sp.* es un patógeno facultativo vegetal que induce la formación de callos o raíces adventicias, dependiendo de si se trata del *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*, respectivamente y es capaz de transferir material genético dentro de la célula vegetal (Gelvin, 2003). Este material genético es denominado T-DNA, el cual se encuentra en un plásmido denominado Ti y es transferido mediante un proceso de conjugación, siendo uno de los pocos ejemplos de transferencia horizontal entre organismos de distintos reinos (Gelvin, 2012, Gelvin, 2010). Cepas atenuadas de esta bacteria se utilizan como vectores de transformación de una gran variedad de mono- y

dicotiledóneas (Lessard y col 2002). Los sistemas de expresión transitoria más empleados en plantas también hacen uso de la maquinaria de *Agrobacterium sp* donde la bacteria se infiltra directamente en las hojas donde expresarán las proteínas que luego de unos días son cosechadas.

1.1.2 Bioseguridad y autenticidad del producto

Las células vegetales carecen de endotoxinas como las encontradas en bacterias y, a su vez, no son huéspedes de patógenos animales o humanos por lo que la seguridad del producto es mayor que en los sistemas eucariotas convencionales (Dirisala y col 2016). A sí mismo, las diferencias existentes entre los sistemas animales y vegetales, hace que estos mismos puedan ser utilizados para la producción de proteínas como factores de traducción y hormonas, sin que estas interfieran con el desarrollo del organismo. Además, la síntesis de proteínas es un proceso altamente conservado entre organismos vegetales y animales, de manera que las células vegetales son capaces de plegar correctamente las proteínas y de realizar las modificaciones post-traduccionales de forma similar a las células animales, por lo cual los sistemas de expresión basados en plantas son capaces de producir todo tipo de proteínas, desde pequeños péptidos hasta moléculas complejas como las inmunoglobulinas IgA secretorias (Ma y col 1995) como así también IgM pentaméricas (Loos y col 2014), hemoglobina (Dieryck y col 1997) y colágeno (Stein y col 2009, Shoseyov y col 2014). A pesar que la mayoría de las PTMs son altamente conservadas entre animales y plantas, existen importantes modificaciones específicas de plantas las cuales pueden impactar en la funcionalidad del producto obtenido. Las diferencias en las PTMs serán detalladas más adelante.

1.1.3 Costos de producción

En términos económicos, los sistemas vegetales han demostrado ser más ventajosos por la eficiencia en los costos, la facilidad para el cultivo y el almacenamiento, así como el escalado (McNulty y col 2019, Nandi y col 2016, Walwyn y col 2015). La producción utilizando plantas transgénicas es fácilmente escalable aumentando el área de cultivo de acuerdo con la demanda del producto, utilizando la infraestructuras de cosechado, almacenamiento y transporte tradicional (Hood, 2002).

El potencial económico de los PBP ha sido estimado mediante análisis tecnoeconómico (TEA, techno-economic analysis) para varias plataformas de producción basadas en plantas, e incluso en algunos se han comparado múltiples sistemas.

La tabla 1 muestra una selección de TEA de sistemas basados en plantas realizados recientemente publicados. La comparación de estos estudios es compleja debido a diferencias en las plataformas utilizadas, escalas de producción y la falta de estandarización.

Tabla 1: Análisis tecnoeconómicos para diferentes sistemas de producción basados en plantas

Parámetro	Unidad	Tuse y col (2014)		Walwyn y col (2015)	Nandi y col (2016)
		1	2		
Finalidad		Farmacéutico	Biocombustible	Reactivo	Farmacéutico
Molécula		Butirilcolinesterasa	Enzima celulasa	HRP	Anticuerpo monoclonal
Sistema de expresión		Nicotiana benthamiana. Transitoria, agroinfiltración	Nicotiana benthamiana. Transgénica, inducible	Nicotiana benthamiana. Transitoria, agroinfiltración	Nicotiana benthamiana. Transitoria, agroinfiltración
Producción	Kg/ año	25	3x10 ⁶	5	300 – 700
Expresión	g/ Kg FW	0,5	4	0,24	1
Recuperación	%	20	-	54	65
Pureza	%	>95	-	250 kU/ g	>95
CAPEX	U\$D millones	92,4 (U/D 3:7)	11,5 (U/D 10:0)	-	122 - 300 (U/D 4:6)
COGS	U\$S/ g	1180 (U/D 3:7)	6,9x10 ⁻³ (U/D 10:0)	1279 (U/D 2:8)	90 – 121 (U/D 4:6)

Abreviaciones: CAPEX (*Capital expenditures*), gasto de capital, es el coste de desarrollo o el suministro de componentes no consumibles para el producto o sistema. COGS (*Cost of Goods Sold*), costo de bienes vendidos el cual indica la relación entre las ventas y los gastos necesarios de producción. U/D relación entre los costos upstream y downstream. HRP (*horseradish peroxidase*) peroxidasa de rabanito.

En el caso de Tusé y cols (2014) se realizó un análisis comprensivo de enzimas terapéuticas (butirilcolinesterasa) y no terapéuticas (celulasas) utilizando un sistema de expresión transitorio en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Los COGS estimados fueron de U\$D1185/g y U\$D6.98/kg para butirilcolinesterasa y celulasa, respectivamente. Este

estudio indicó que para el caso de producción de celulasas, el sistema es competitivo respecto al sistema de producción basado en hongos, representando una disminución del 85% de la inversión necesaria y de un 30% del COGS final. Por otro lado, Walwyn y cols (2015) también describió la producción de una enzima no terapéutica, la peroxidasa de rabanito (HRP, Horseradish peroxidase). Este estudio indica que el sistema de producción propuesto sólo es competitivo respecto al sistema de cultivo tradicional si la escala de producción es superior a 5 kg HRP/año, indicando que el sistema sería competitivo a menor capacidad productiva si los niveles de expresión y/o los rendimientos de purificación fueran incrementados.

Nandi y cols (2016) realizaron una de las pocas comparaciones entre células animales y plantas. En este estudio se estimó un COGS de U\$D232/g para un anticuerpo monoclonal producido utilizando el sistema convencional de células de ovario de hámster chino (CHO, *chinese hamster ovary*) en instalaciones de alta capacidad (1000 kg/año) con un título de 1 g/L. En este escenario, el sistema basado en plantas con una capacidad inferior (600 kg/año) presentó un COGS de U\$S99/g representando una reducción superior al 50% de los costos de manufactura.

1.2. Las plantas como biorreactores para la producción de anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales (mAbs, *monoclonal antibodies*) son el grupo de proteínas recombinantes más importantes por sus aplicaciones en terapia, diagnóstico e investigación. Actualmente, 87 mAbs con aplicaciones terapéuticas han sido aprobados para su comercialización en Estados Unidos y/o Europa (<https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>).

Los mAbs representaron aproximadamente el 50% de las ventas totales de biofarmacéuticos en 2017, con ventas anuales que alcanzaron los 90 billones de U.S. dólares y cuyas proyecciones son s 125 billones U.S.\$ para 2020 (Donini y Marusic, 2019, Yusibov y col 2016, Mir-Artigues y col 2019). Debido a sus aplicaciones a nivel terapéutico y no-terapéutico, la demanda en el mercado de estas moléculas es elevada y existe una creciente necesidad de desarrollar métodos alternativos para la producción de inmunoglobulinas con diferentes aplicaciones (Yusibov y col 2016). Uno de los motivos es la necesidad de disminuir los costos de producción relacionados a su síntesis en sistemas de expresión tradicionales que se basan en el cultivo de células de

mamíferos. Este alto costo determina que los tratamientos terapéuticos con mAbs sean muy onerosos pudiendo llegar a 120 000 USD/paciente/año (Stacy, 2005). La otra razón se relaciona con la baja actividad específica de los mAbs que determina que para algunos tratamientos un paciente deba recibir entre 1 – 5 g de proteína pura al año. Teniendo en cuenta la alta prevalencia de cánceres y trastornos del sistema inmunológico la cantidad de pacientes a tratar es enorme por lo que la demanda supera las toneladas al año. Los costos de biorreactores con esta capacidad de producción son muy elevados por lo que hay una demanda insatisfecha.

La situación en Argentina es similar a la de otros países en cuanto a lo costoso de los tratamientos con anticuerpos terapéuticos. Por ejemplo, una dosis de Humira (adalimumab) y de Ilaris (canakinumab) tienen un precio de 800 y 20000 USD (<https://servicios.pami.org.ar/vademecum/views/consultaPublica/listado.zul>). Este alto costo es responsable de la balanza comercial negativa para la importación de productos farmacéuticos que fue del orden 17% (US\$ 925,4 millones) en el año 2017 (Ministerio de Economía y Finanzas Públicas, 2018). Aunque la caducidad de las patentes de los mAbs y la aparición de los productos biosimilares pueden ayudar a una reducción del precio de los mAb se requiere de modificaciones de los procesos de producción ya sea *Upstream* o *Downstream* para hacerlos más competitivos, y en este sentido las PBP tienen mucho potencial.

1.3 Estructura, síntesis y función de inmunoglobulinas

La estructura básica de los mAbs está constituida por dos cadenas livianas (LC, *light chain*, isotipos κ o λ) y dos cadenas pesadas (HC, *heavy chain*, isotipos α , δ , ϵ y μ), las cuales se componen por dominios de inmunoglobulina (Ig) compactos, en los cuales la formación de enlace disulfuro tiene un papel crucial en su estabilización, además de acelerar el proceso de plegado y reducir la tendencia a formar agregados, demostrándose una estrecha relación entre el proceso de plegado proteico y el plegamiento oxidativo, a su vez, la estructura del anticuerpo es estabilizada por la presencia de puentes disulfuro entre HC y LC (Feige y Buchner, 2014, Ellgaard y col 2016). Cada cadena pesada se compone de una región variable y tres o cuatro regiones constantes según el tipo de inmunoglobulina, mientras que cada cadena ligera consta de una región variable y una región constante. Además, es posible dividir al anticuerpo en

dos porciones funcionalmente diferentes: la región Fab (*antigen binding Frangment*), implicada en el reconocimiento y unión al antígeno y la región Fc (*cristalizable Fragment*) involucrada en las funciones efectoras del anticuerpo (Figura 1) (Feige y Buchner, 2014).

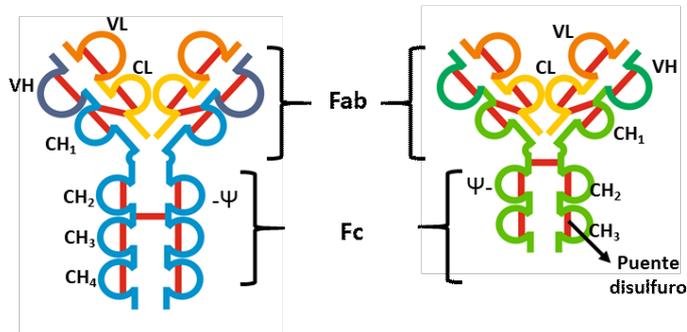


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de las inmunoglobulinas

Cada cadena pesada se compone de una región variable y tres (verde) o cuatro (azul) regiones constantes según el tipo de inmunoglobulina, mientras que cada cadena ligera (naranja) consta de una región variable y una región constante. Fab: sitio de unión al antígeno, Fc: región constante.

El plegamiento y ensamblado de las inmunoglobulinas ocurre en el retículo endoplásmico (ER, *endoplasmic reticulum*), siendo un proceso complejo que necesita de la acción conjunta de diversas enzimas y chaperonas. Mientras que las cadenas livianas se secretan del ER cuando se expresan individualmente, las cadenas pesadas muestran un desorden intrínseco en el dominio 1 de la región constante de la cadena pesada (CH1) *in vitro*, y son activa y eficientemente retenidas en el ER por la chaperona BiP, lo cual inhibe el colapso prematuro de la cadena polipeptídica. BiP puede ser desplazada por LC, la cual induce el plegado de CH1, este proceso es limitado por la isomerización de residuos de prolina (Pro), catalizada por la enzima peptidil prolil-isomerasa (PPIasa, *prolyl-isomerase*) y se vuelve irreversible tras la formación de los enlaces disulfuro intercatenarios entre LC y HC (Feige y col 2009, Feige y col 2010, Feige y Buchner, 2014) (Figura 2).

Dos moléculas cuya expresión ha sido particularmente estudiada en plantas son las IgM e IgA. Estas moléculas pertenecen al grupo de inmunoglobulinas multiméricas y son consideradas proteínas complicadas de producir, debido a que requieren complejas PTMs y ensamblaje de varias subunidades para ser funcionales (Vasilev y col 2016). Su estructura básica monomérica es igual a la de las demás clases de inmunoglobulinas esquematizadas en la figura 1. Las moléculas de IgM son pentaméricas mientras que las IgA son diméricas (Figura 3A y B) y el proceso de multimerización es mediado por un polipéptido adicional de bajo peso molecular denominado cadena J, el cual se une al

penúltimo residuo de cisteína (Cys) conservado de las cadenas pesadas por puentes disulfuro (Vasilev y col 2016). El anticuerpo anti-cáncer PAT-SM6 fue la primer IgM pentamérica producida en plantas y se demostró que las diferentes glicoverciones del mismo se unieron a su antígeno con igual afinidad que la versión de mamífero (Loos y col 2014).

El caso de las IgA secretorias (SIgA, figura 3C) es particularmente complejo, en mamíferos, estos anticuerpos son el isotipo más importante en protección de mucosas, y su formación requiere de dos tipos celulares diferentes: los linfocitos B, donde se produce la síntesis y ensamblado de la IgA dimérica; y de las células del epitelio intestinal, donde se unen al receptor polimérico de Ig (pIgR, *polymeric Ig receptor*), el cual sufre un clivaje en su región extracelular, llamada componente secretorio (SC, *secretory component*) luego de ser translocación al lumen intestinal. Este SC se mantiene unido al dímero de IgA, formándose una estructura heteromultimérica (Orzaez y col 2009). La función del SC es proteger a las SIgA de la degradación proteolítica en mucosas (Larrick y col 2001). Planet Biotechnology® produjo el primer anticuerpo recombinante producido en plantas testeado clínicamente, CaroRx (Tabla 1) (Dirisala y col 2016). Este anticuerpo es un híbrido IgA-IgG secretorio producido en plantas transgénicas de tabaco y reconoce específicamente al antígeno de superficie I/II de *Streptococcus mutans*, el microorganismo causante del deterioro dental (Yusibov y col 2011).

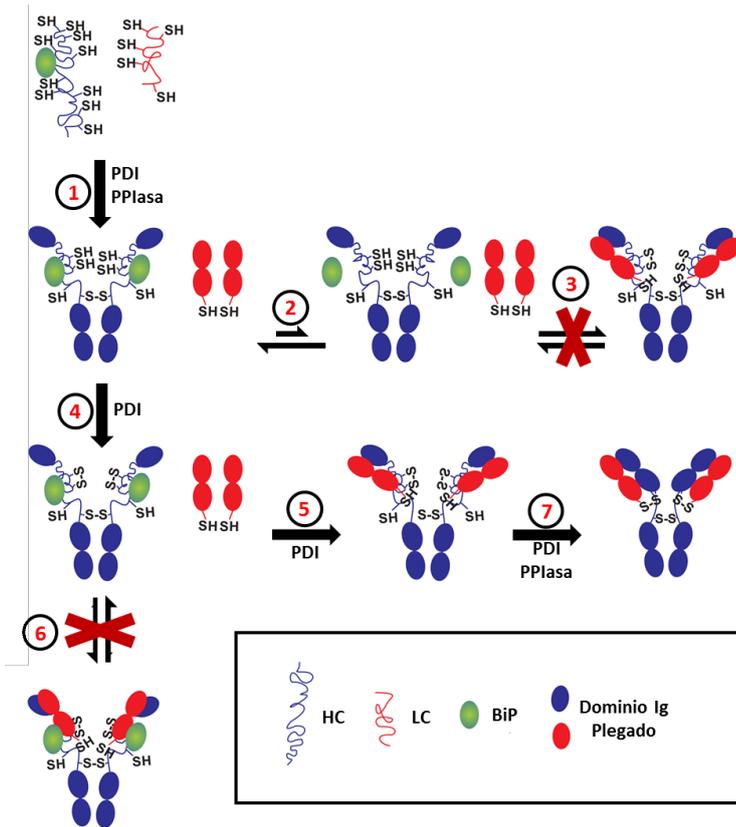


Figura 2. Representación esquemática del proceso de ensamblado y formación de enlaces disulfuro de un anticuerpo.

1 Formación de enlaces disulfuro e isomerización de residuos de Pro de los dominios de inmunoglobulina de HC (azul) y LC (rojo) de un anticuerpo, catalizadas por la Proteína disulfuro isómeras (PDI, *protein disulfide-isomerase*) y la PPIasa (peptidyl prolyl isomerase), respectivamente.

2 La chaperona BiP se mantiene unida al dominio CH1 formando complejos altamente estables, evitando el colapso de la cadena polipeptídica. El pliegado del dominio CH3 induce la dimerización de HC, la cual será afianzada por la formación de enlaces disulfuro.

3 LC es incapaz de unirse a HC mientras CH1 no se encuentra pliegado.

4 Oxidación de los residuos de Cys dentro de CH1 catalizado por PDI, la afinidad de BiP por este dominio no se ve altamente afectada.

5 LC desplaza a BiP e induce el pliegado de CH1.

6 CH1 debe formar sus puentes disulfuro internos y ser liberada de BiP antes de asociarse a LC.

7 Una vez que los residuos importantes de Pro de CH1 son isomerizados por PPIasa, PDI cataliza la formación de los puentes disulfuro intercatenários entre LC y HC.

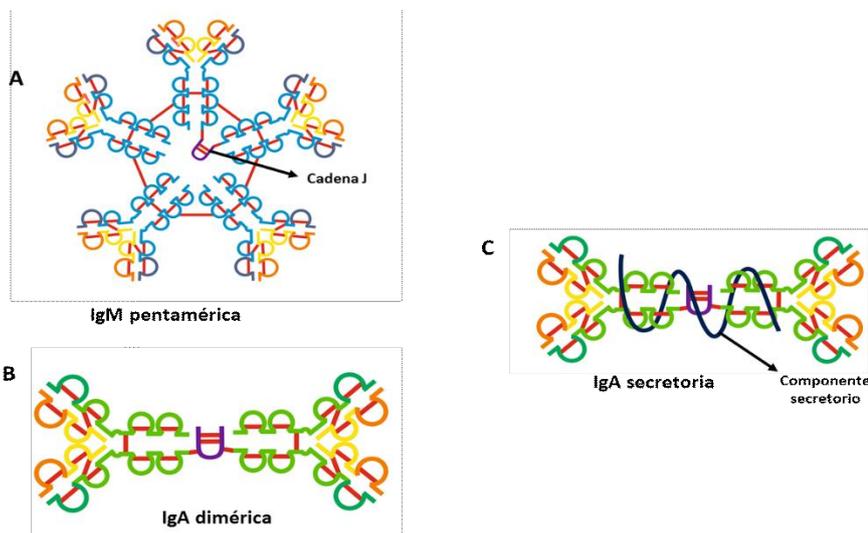


Figura 3. Representación esquemática de las estructuras multiméricas de IgM e IgA

A IgM pentamérica con cadena J (violeta). **B** IgA dimérica con cadena J (violeta). **C** IgA secretoria, la cadena J se muestra en violeta y el componente secretorio en azul.

Otro rasgo característico de los anticuerpos, es que presentan un sitio de glicosilación en el subdominio constante CH2 de la cadena pesada (Figura 1, ψ); los diferentes grados de glicosilación en este sitio, afectan la vida media en sangre del

anticuerpo (Gerasimova y col 2016, Webster y Thomas, 2012) y, la habilidad del anticuerpo de desencadenar reacciones de citotoxicidad, ya sea dependiente de complemento (DCAC, *Complement-dependent antibody cytotoxicity*) o dependiente de células (ADCC, *antibody dependent cellular toxicity*) (Jefferis, 2007; Jefferis, 2016; Jefferis et al, 1998). Es por ello que, si la inmunoglobulina va a ser utilizada con fines terapéuticos, es necesario que posea el grado de glicosilación adecuado.

Los requerimientos de procesado, ensamblado de múltiples cadenas, la necesidad de la formación de enlaces disulfuro y la glicosilación hacen que los anticuerpos completos puedan ser expresados únicamente en organismos eucariotas superiores. En este contexto, en la tabla 2 se citan diferentes ejemplos de anticuerpos producidos eficientemente en plantas y que han alcanzado la etapa de comercialización o se encuentran en etapas avanzadas de evaluación clínica. Además del ejemplo previamente citado de CaroRx, otro ejemplo destacable es ZMapp[®], un cocktail de tres anticuerpos monoclonales humanos producidos por expresión transitoria en plantas de tabaco cuyo uso fue aprobado por la Organización Mundial de la Salud para tratar a un número reducido de infectados 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).

Tabla 2: Anticuerpos producidos en plantas que se encuentran en el mercado o en etapas avanzadas de desarrollo

Empresa/País	Productos	Especie Vegetal y órgano	Método Transformación	Estado y aplicación	Referencia
Plantas transgénicas					
Plantel Biotechnology (USA)	CaroRx mAb IgG/A <i>Streptococcus mutans</i>	<i>N. tabacum</i> / Hojas	Estable	Aprobado/ Dispositivo médico	(Schillberg y col 2005, Sack y col 2015)
Consorcio Europeo Plant-Pharma	mAb humano Anti-HIV	<i>N. tabacum</i> / Hojas	Estable	Fase I/ Prevención HIV	(Ma y col 2015)
Expresión transitoria					
Mapp Biopharmaceutical y LeafBio Inc, (USA)	ZMapp™, Anti-Ebola Cocktail de Inmunoglobulina G quiméricas	<i>N. benthamiana</i> / Hojas	Transitoria	Fase II/ tratamiento de infecciones con el virus del Ebola	(Mapp Biopharmaceuticals, 2015)
Icon Genetics GmbH (Alemania) parte salud adquirida por Denka Seiken Co., Ltd (Japón). El resto propiedad de Nomad Bioscience (Alemania)	Inmunoglobulina G anti idiotipo personalizada que derivada del linfoma de Hodgkin del paciente	<i>N. benthamiana</i> / Hojas	Transitoria-MagnICON	Fase I/ vacuna terapéutica para linfomas de Hodgkin	(Tusé, 2011)
ValorBiotherapeutics (unión de Caliber Biotherapeutics, y ImmunGene, Inc), iBio Inc adquirió Caliber Biotherapeutics.	Anticuerpo monoclonal anti-CD20 unido a interferón (IFN) alfa	<i>N. benthamiana</i> / Hojas	Transitoria-Vector basado en TMV de dos componentes.	Fase I/ biobetter de rituximab, desordenes inflamatorios.	http://www.valorbiotherapeutics.com/ NCT02519270 (2015) ClinicalTrials.gov NCT02847949 (2016)
PlantForm Corp (Canadá)	Trastuzumab	<i>N. tabacum</i> / Hojas	Transitoria	Biosimilar de la herceptina, cáncer de mama	http://www.plantformcorp.com/overview.aspx
Cultivo in vitro					
Protalix Biotherapeutics (Israel)	anti TNF α - FC	Tabaco/ células en suspensión BY2	Estable	Fase I Artritis reumatoidea, soriasis, Enfermedad. Bowel, Crohn,	http://protalix.com/pipeline/ (Shaaltiel y col 2012)

1.4. Situación actual de los sistemas de expresión basados en plantas

La demanda mundial de proteínas recombinantes es muy grande. La industria farmacéutica posee más 400 productos biológicos aprobados que representan el 24% de las ventas productos farmacéuticos, cuyo mercado superó los 1200 billones US\$ en el año 2018 (EvaluatePharma, 2018, Statistics, 2019). Los anticuerpos monoclonales lideran el grupo de proteínas farmacéuticas, sus ventas superaron los 90 billones de US\$ en 2017 y las proyecciones para el año 2020 son de 125 billones US\$ (Mir-Artigues et al, 2019). Las proteínas terapéuticas (anticuerpos, vacunas, citoquinas, factores de crecimiento) representan aproximadamente el 50% de este mercado, seguido por proteínas de uso industrial y reactivos para investigación y procesos industriales (enzimas o reactivos para purificación) (Markets y Markets, 2019). Los biológicos comercializados en la actualidad son producidos en células de mamíferos (56%), *E. coli*

(19%); *Saccharomyces cerevisiae* (6,5%), células de insectos (4%) y plantas y animales transgénicos (3%) (Baeshen y col 2014, Walsh, 2014), demostrando el predominio de las plataformas ya establecidas de expresión y el surgimiento de sistemas de expresión emergentes.

Numerosos productos con aplicaciones terapéuticas, en diagnóstico, en investigación o en cultivos de tejidos han alcanzado el mercado o se encuentran en etapas avanzadas de desarrollo (Lomonossoff y D'Aoust, 2016, Paul y col 2015), demostrando el éxito de las plantas como sistemas de expresión de proteínas de interés (Tabla 3). Entre los productos que alcanzaron la etapa comercial se destaca la alfa-glucobrosidasa comercializada por Protalix BioTherapeutics (Israel) como Elelyso® (Fox, 2012). Este producto fue producido en células de zanahoria en suspensión siendo el primer biofarmacéutico producido en plantas aprobado por la FDA, en el año 2012 y en cuyo desarrollo fue clave el carácter de medicamento huérfano (Twyman y col 2012). Otro producto aprobado para uso humano en Italia es el colágeno, el cual tiene propiedades superiores en estimular la regeneración de la matriz extracelular que el obtenido de cadáveres animales y es mucho más seguro (Shoseyov y col 2014, Willard y col 2013). El colágeno humano es una proteína heterotrimérica formada por dos subunidades que requieren de modificaciones postraduccionales producidas por la prolil-4-hidroxilasa humana alfa y beta y lisil-hidroxilasa para ensamblarse en fibras. Estos cinco genes fueron coexpresados en plantas transgénicas de tabaco obteniéndose una molécula capaz de inducir la proliferación de células humanas (Stein y col 2009). La molécula de colágeno al igual que la alfa-glucobrosidasa no habían podido ser obtenidas en otros sistemas de expresión y para ambas proteínas se utilizó una estrategia de direccionamiento a vacuolas para los lograr rendimientos adecuados.

Los sistemas de expresión basados en plantas, también han sido utilizados para la producción de biorreactivos que requieren que la molécula producida mantenga su actividad biológica y especificidad. Muchas de estas proteínas son sintetizadas en la vía secretoria y requieren un tipo de procesamiento que sólo se logra en sistemas eucariotas superiores, sumando a que la producción en plantas resulta ser competitiva en términos de costos (Tschofen y col 2016). Un ejemplo de esto es la tripsina bovina, producida en semillas de maíz. Este producto desarrollado por la empresa Prodigene® actualmente es comercializado por Sigma Aldrich.

Otros ejemplos de producción en plantas son aquellos utilizados para medios de cultivo, fundamentalmente de células de mamíferos ya que las plantas no son hospedadoras de patógenos animales, ya sea virus o priones; por lo que el producto es altamente seguro. La empresa InVitria utiliza semillas de arroz para la producción de este tipo de productos como albúmina y lactoferrina recombinante, lisozima y transferrina humana y factores de crecimiento (Tschofen y col 2016).

Además de las plataformas basadas en plantas que ya han alcanzado un estado avanzado de desarrollo con un biológico en comercialización, en la sección anterior se mencionaron diversos anticuerpos que se encuentran en etapas avanzadas de evaluación clínica o etapas preclínicas (Tabla 2) existiendo, además, varias vacunas en etapas similares de desarrollo.

Tabla 3: Biológicos producidos en plantas comercializados o en etapas de desarrollo avanzadas

Empresa/País	Productos	Especie Vegetal y órgano	Método Transformación	Estado y aplicación	Referencia
Cultivo in vitro					
Protalix Biotherapeutics (Israel)	Alfa-glucosidasa	Zanahoria/ células en suspensión	Estable	Aprobada/ Enfermedad de Gaucher	(Fox, 2012)
Natural Bio- Materials (Corea)	Tripsina, enteroquinasa, factores de crecimiento, citoquinas	Arroz / células en suspensión	Estable	Reactivo/ componente de medio de cultivo, cosméticos	http://www.nbms.co.kr
Protalix Biotherapeutics (Israel)	α -Galactosidase-A	Tabaco/ células en suspensión BY2	Estable	Fase III/ enfermedad de Fabry	http://protalix.com/pipeline/ (Shaaltiel y col 2012)
CollPlant (Israel)	anti TNF α - FC	Tabaco/ hojas	Estable	Fase III/ Enfermedad de Fabry	http://www.collplant.com
	Deoxiribonucleasa I (DNasa I) humana			Fase I Fibrosis quística	
	Anti TNF α - FC			Fase I/ Artritis reumatoidea, soriasis, Enfermedad de Bowel y enfermedad de Crohn.	
Greenovation Biotech (Alemania)	α -galactosidase-A	Musgo (<i>Physcomitrella patens</i>)	Estable	Fase I/ Enfermedad de Fabry	http://www.greenovation.com (Reski y col 2015)
Plantas transgénicas					
CollPlant (Israel)	Colágeno	Tabaco/ hojas	Estable	Aprobado, dispositivo médico	http://www.collplant.com
Sigma Aldrich (USA)	Tripsina Bovina (TrypZean®), Avidina	Maíz/semilla	Estable	Reactivos	http://www.sigmaaldrich.com
	Endo β 1,4 glucanasa <i>Acidothermus cellulolyticus</i> .			Reactivos, producción biocombustibles	
Infinite Enzyme (comercializados por Sigma Aldrich)	Cellobiohidrolasa I de <i>Hypocrea jecorina</i>	Maíz /semilla	Estable	Reactivos, producción biocombustibles	http://www.infiniteenzymes.com
	Peroxidasa <i>Phanerochaete chrysosporium</i>			Reactivos	http://www.sigmaaldrich.com
Syngenta (USA)	Alfa amilasa	Maíz /semilla	Estable	Producción de bioetanol	http://www.syngenta.com
Origin Agritech (China)	Fitasa	/semilla Maíz	Estable	Nutrición animal	ginseed.com.cn http://www.ori

Empresa/País	Productos	Especie Vegetal y órgano	Método Transformación	Estado y aplicación	Referencia
ORF Genetics (Islandia)	Factores de crecimiento, citoquinas	Cebada /semilla	Estable	Reactivos	http://www.orfgenetics.com
Sif Genetics (Islandia)	Factores de crecimiento	Cebada /semilla	Estable	Cosméticos	http://www.sifcosmetics.com
Ventria Bioscience/ InVitria (USA)	Albumina, lactoferrina, lisozima, transferrina, factor inhibidor de leucemia	Arroz (semillas)	Estable	Reactivos, componente medio de cultivo	https://www.invitria.com/
Nexgen Biotechnology (Corea)	Factores de crecimiento	Tabaco/ hojas	Estable	medio de cultivo Componente de	http://www.nexenbiotech.com/
Leaf Resources, Australia	Glycell TM	especies Varias	Estable/ InPact	Bioproceso para obtener biocombustibles	http://www.leafresources.com.au (Dugdale y col 2014)
INDEAR/BIOCERES (Argentina)	Quimosina	Cártamo	Estable	Fabricación de quesos	http://www.bioceres.com.ar
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, (Japón)	Interferón alfa canino	Frutilla	Estable	Gingivitis canina Aprobado	(Drake y col 2017)
Ventria Bioscience (USA)	Lactoferrina (VEN100)	Arroz	Estable	Fase II/ Antidiarrea, antiinflamatorio	(Sack y col 2015)
	VEN120			Fase I/ Enfermedad Bowel	
	VEN130			Fase II/ Osteoporosis	
Institute Medical Science (Universidad de Tokyo, Japón)	Toxina colérica subunidad B	Arroz	Estable	Fase I/ Vacuna oral veterinaria	(Takeyama y col 2015)
Plant Biotechnology (USA)	ICAM1-(Intercelular adhesión molecul 1)-FC	Tabaco/ Hojas	Estable	Fase I/ Prevención infecciones HRV (Human Rhinop Virus)	http://www.planetbiotechnology.com/products.html (Wycoff y col 2015)
	CMG2(PBI-220) Inmunoadhesina <i>B. anthracis</i>			Tratamiento y prevención del anthrax	
Expresión transitoria					
Kentucky Bio-Processing (USA)	Aprotinina	Tabaco/ hojas	Temporal- MagnICON	Reactivo	http://www.kbpllc.com
Agrenvec (España)	Factores de crecimiento, citoquinas, tioredoxina humana, Inhibidor tisular de metaloproteinasas	Tabaco/ hojas	Temporal	Reactivos	http://www.agrenvec.com

Empresa/País	Productos	Especie Vegetal y órgano	Método Transformación	Estado y aplicación	Referencia
Medicago (Canada) Adquirida por Mitsubishi Tanabe Pharma Corp (Japón) en 2013	Vacuna contra la gripe pandémica H1N5	<i>N. benthamiana</i> / Hojas	Transitoria – VLF	Fase II/ Aprobada para emergencias/ Prevención gripe pandémica	http://medicago.com/pandemic-flu/
	Vacuna cuatrivalente contra gripe estacional H1N1, H3N2, B			Fase III/ Prevención gripe estacional	http://medicago.com/pipeline-progress/
Fraunhofer enter for Molecular Biotechnology (FhCMB) y eiBio Inc (USA). Luego de conflicto legal eiBio Inc obtuvo los derechos exclusivos del uso de la plataforma.	Protective Antigen PA83-FhCMB	<i>N. benthamiana</i> / Hojas	Transitoria-Vector basado en TMV de dos componentes.	Fase I/ Anthrax	ClinicalTrials.gov NCT02239172 (2014)
	Vacuna contra Malaria Pfs25 – VPL- FhCMB			Fase I/ Vacuna contra Malaria	ClinicalTrials.gov NCT02013687 (2013)
	Vacuna contra gripe N1H5			Fase I/ Vacuna Influenza H5N1	ClinicalTrials.gov NCT01250795 (2010)
	Vacuna contra gripe N1H1			Fase I/ Vacuna gripe N1H1	ClinicalTrials.gov NCT01177202 (2010)
Plataforma basada en planta acuática					
Biolex Therapeutics, Inc. fue adquirida por Synthon (Holanda) 2012	PEG-interferon Alfa-2b	Lenteja de agua (<i>Lemna minor</i>)	Estable	Fase 2b/ Hepatitis C	ClinicalTrials.gov NCT00593151, NCT00863239, NCT00953589,
Phyco Biologics (USA)	Vacunas, inmunoadyuvantes, enzimas, factores de crecimiento	Alga verde <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Estable en cloroplasto	En desarrollo	www.phycotransgenics.com (Yao y col 2015)

2. Estrategias empleadas para mejorar los niveles de acumulación de proteínas recombinantes en plantas

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

Un factor clave para que un sistema de expresión sea rentable es alcanzar altos niveles de acumulación de la proteína foránea, ya que cuanto mayor es el rendimiento menor es el costo de producción. Si bien se han logrado grandes avances en los sistemas de producción basados en plantas, en muchos casos los niveles alcanzados son inferiores que los obtenidos en otros sistemas de producción. En este sentido, los rendimientos alcanzados dependerán principalmente de dos factores, la síntesis y degradación de la proteína de interés (Egelkroun y col 2012). La velocidad de síntesis es dependiente tanto de la eficiencia de transcripción como de traducción. Por otro lado, la velocidad de degradación dependerá de la capacidad que tiene la célula para plegar de manera correcta la proteína heteróloga y de la susceptibilidad de la misma a la proteólisis (Figura 4). En este sentido, diferentes estrategias han sido empleadas para modificar estos factores con la finalidad de alcanzar mejores rendimientos del proceso productivo.

Velocidad de la transcripción

- Promotor utilizado
- Secuencias terminadoras utilizadas
- Secuencias enhancer (facilitadoras)
- Secuencias silenciadoras
- Secuencias MARS (matrix attachments regions)
- Presencia de intrones
- Silenciamiento transcripcional

Estabilidad y transporte del mRNA

- Eliminación de intrones
- Edición
- Adición del CAP
- Adición de cola poly-A
- Presencia de codones de iniciación y terminación
- Estructuras secundarias
- Sitios reconocidos por RNAsas
- Secuencias ricas en AU
- Silenciamiento post-transcripcional

Velocidad de la traducción

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

Estabilidad proteínica

- Plegamiento proteínico
- Localización celular
- Modificaciones post-transcripcionales
- Fusión a secuencias estabilizadoras

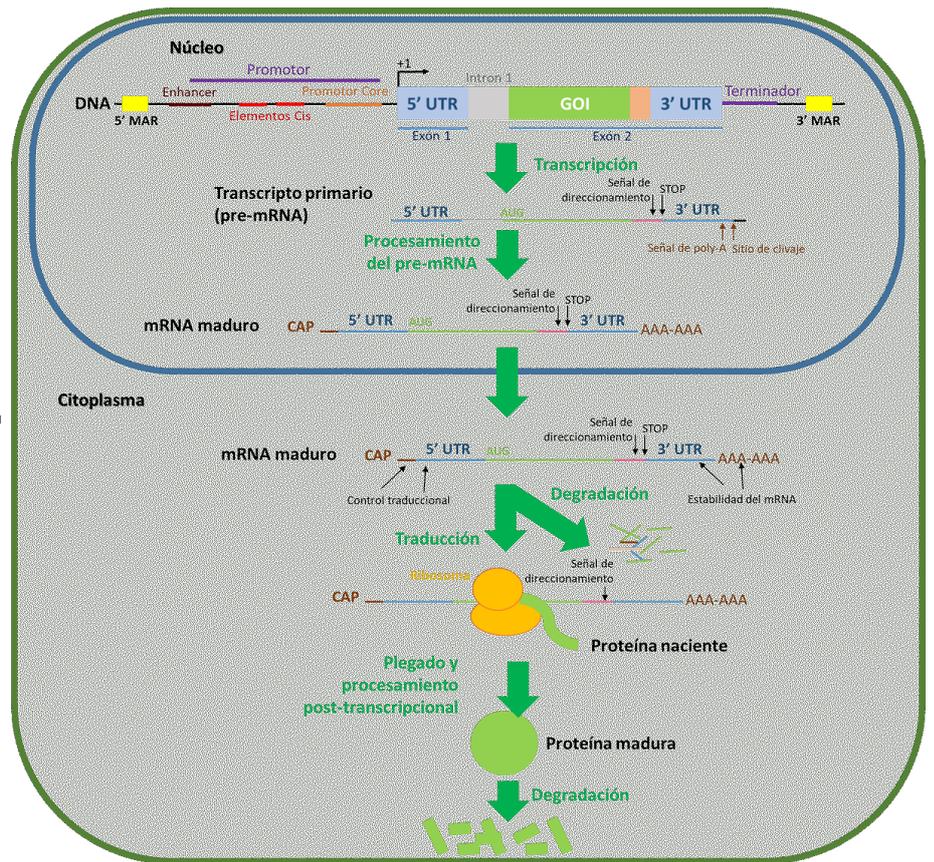


Figura 4. Factores que afectan la expresión de genes.

El gen de interés (GOI, *gene of interest*), se clona en el vector que contiene el *cassette* de expresión que incluye el promotor, la señal de terminación de la transcripción, las regiones no traducidas (UTR, *untranslated regions*) a ambos lados de la secuencia codificante (5' y 3') y secuencias que codifican para señales de direccionamiento. Pueden incluirse también secuencias *enhancer* que incrementan la transcripción y MARS (*matrix attachment regions*) que evitan la formación de heterocromatina. El promotor tiene una región *core* donde se une la maquinaria basal y elementos *cis* a los que unen factores que regulan la transcripción facilitando el reclutamiento de la maquinaria basal. Se puede incluir un intrón (gris) que mejorará la eficiencia de transcripción y el mismo debe tener secuencias de *splicing* reconocidas por la maquinaria de la célula vegetal huésped. El DNA es transcrito obteniéndose el pre-mRNA que es procesado por la adición del CAP en el 5', la cola de poli-(A) en el 3', la eliminación de intrones (*splicing*) y en algunos casos es editado. El mRNA maduro es transportado al citoplasma donde es traducido. Las secuencias 5' y 3' UTR desempeñan un papel importante en el reconocimiento del mRNA por ribosomas y en la estabilidad del mRNA. Los mRNA sin codón de inicio o de terminación, o que poseen secuencias que incrementan su inestabilidad son degradados. La eficiencia de traducción depende de la presencia de la secuencia de Kozak, del uso de codones y de si el mRNA forma *loops* que afectan el avance de ribosomas. La proteína naciente se pliega en algunos casos con la intervención de chaperonas y es transportada a diferentes compartimientos celulares dependiendo de la señal de direccionamiento. Las proteínas mal plegadas o que sufrieron alteraciones son degradadas.

2.1. Velocidad de la transcripción

La eficiencia de la transcripción depende fundamentalmente del promotor escogido, de la presencia de secuencias facilitadoras (*enhancers*), de la incorporación de intrones, de la secuencia de terminación de la transcripción y otros elementos regulatorios que afectan el estado la cromatina (Egelkrout y col 2012). En este sentido, existen numerosas opciones de promotores para la expresión en plantas, siendo el más utilizado, y con el que se han alcanzado altos niveles de expresión, el promotor 35S del virus del mosaico del Coliflor (35S CaMV, *cauliflower mosaic virus*) (Odell y col 1985). A su vez, podemos mencionar el promotor de la ubiquitina, ampliamente utilizado para expresión en monocotilédneas (Christensen y Quail, 1996). En los últimos años se encontraron promotores que son más adecuados y activos según el sistema de expresión utilizado, entre ellos podemos mencionar el de la plastocianina (Vezina y col 2009), el de la faseolina, utilizado para expresar en semillas (De Jaeger y col 2002) y el del alfa prima beta conglicina (Petruccelli y col 2006a). Además, existen promotores sintéticos (Koul y col 2012) y promotores inducibles (Dugdale y col 2014).

2.2. Estabilidad y transporte del mRNA

La traducción del RNA mensajero (mRNA) a proteína es un requerimiento clave para la acumulación de proteínas. Incluso si se utiliza un promotor activo, los niveles de mRNA pueden ser bajos debido a silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, *post-translational gene silencing*) o inestabilidad del mRNA. En este sentido, una estrategia que se aplica para mejorar los rendimientos al utilizar sistemas de expresión transitoria lo constituyen el uso de supresores virales del PTGS (Voinnet y col 2003). Se pueden utilizar distintos supresores de PTGS derivados de distintos virus: RYMV-p1 (*Rice Yellow Mottle Virus*), GVA-p10 (*Grapevine Virus A*), TBSV-p19 (*Tomato Bushy Stunt Virus*), BYVp21 (*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 (De Muyenck y col 2010, Circelli y col 2010, Arzola y col 2011). Con el uso de este tipo de PTGS se ha conseguido mejorar la

expresión pasando de obtener 5% a un 15% TSP (*total soluble protein*), utilizando el supresor de silenciamiento TBSV-p19 (Circelli y col 2010).

2.3. Velocidad de la traducción

La velocidad de traducción depende principalmente de las regiones 5' y 3' UTR y del uso de codones. En este sentido, para mejorar la eficiencia y fidelidad de la traducción de la proteína de interés, una estrategia utilizada es optimizar el uso de codones del transgen para adecuarlo al de la especie vegetal empleada, a su vez, incluir la secuencia de Kozak, evitar la presencia de regiones ricas en AT, las cuales generan la formación de sitios de splicing crípticos y evitar la formación de estructuras secundarias del mRNA (Egelkrout y col 2012). Existen diferentes algoritmos para la optimización de codones, algunos de ellos ajustan el uso de codones para que sea proporcional a la frecuencia de aparición en el organismo huésped, otros utilizan el codón más frecuente para todas las instancias de aparición del aminoácido mientras que también existen algoritmos que consideran los RNA de transferencia (tRNA) más frecuentes y optimizan el uso de codones teniendo en cuenta esta abundancia (Mauro y Chappell, 2014). Independientemente del algoritmo usado, en la bibliografía los resultados reportados no son siempre positivos, existiendo casos donde los niveles de acumulación aumentan hasta 1000 veces y casos en los que utilizando el mismo algoritmo no se observan diferencias significativas o, incluso, en los que el gen nativo produce mayores rendimientos (Egelkrout y col 2012, Gustafsson y col 2012, Quax y col 2015).

2.4. Estabilidad proteica

Como se mencionó anteriormente, otro de los factores importante que impactan en los rendimientos de la producción de proteínas heterologas es la degradación proteolítica, teniendo la localización subcelular, en diferentes organos y/o tejidos, un profundo impacto en los rendimientos obtenidos. En este sentido, hay que considerar que la mayoría de las proteínas de interés producidas en plantas son direccionadas a la vía secretoria, debido a que requieren determinadas PTMs para ensamblarse correctamente y ser funcionales. El destino final de estas proteínas suele ser el apoplasto, lugar donde se ha informado que existe una intensa degradación (Benchabane y col 2008a, Goulet y col 2012, Niemer y col 2014), este problema puede

revertirse parcialmente mediante la co-secreción o agroinfiltración (según el sistema de expresión utilizado) de inhibidores de proteasas (Benchabane y col 2008a, Goulet y col 2012, Niemer y col 2014). Para evitar que la proteína se dirija al apoplasto, pueden utilizarse distintas estrategias de direccionamiento subcelular, como la retención en retículo endoplásmico (De Muynck y col 2010, Petruccelli y col 2006a, Julve Parreno y col 2018) y direccionamiento vacuolar (Yang y col 2016, Shaaltiel y col 2007, De Marchis y col 2013, Jha y col 2012, Marin Viegas y col 2015). Hasta el momento la más eficiente sigue siendo la retención en el retículo endoplásmico, aunque su efecto es dependiente de la proteína (De Muynck y col 2010). En el caso de la expresión en semillas, se recurre a la acumulación en endosperma o cotiledones, y la proteína foránea es almacenada en los cuerpos proteicos (ER-PB, ER *protein bodies*) o vacuolas de reserva de proteínas (PSV, *protein storage vacuoles*) dependiendo de la especie (Stoger y col., 2005; Rademacher y col., 2008; Rademacher y col., 2009). También se ha observado que el uso de algunas secuencias peptídicas insolubles como los polímeros similares a elastina (ELP, *elastin like protein*) (Floss y col 2010) o la utilización de fusiones a hidrofobinas (Joensuu y col 2010), y secuencias derivadas de prolaminas como la zeolina (Francin-Allami y col 2011), pueden incrementar la acumulación de proteína de interés. En el caso de los polímeros similares a elastina e hidrofobinas, su uso también facilita la recuperación de la proteína de interés (Floss y col 2010).

3. Modificaciones post-traduccionales en plantas

Las PTMs son modificaciones que sufre una proteína una vez finalizada la traducción por el ribosoma. Existen más de 300 tipos de PTMs que se pueden dividir en cuatro grandes grupos: adición de grupos funcionales, adición de proteínas o péptidos, cambios estructurales de la proteína o cambio de la naturaleza química de algún aminoácido (Ytterberg y Jensen, 2010, Gerasimova y col 2016). Las PTMs afectan propiedades fundamentales de las proteínas, como su actividad, localización, estabilidad e interacción con otras proteínas. Una proteína puede sufrir modificaciones sencillas o incluso sufrir varias e intrincadas modificaciones. Desde un punto de vista evolutivo, las PTMs son una forma de aumentar exponencialmente el número de proteínas posibles, siendo una forma eficiente de diversificar el genoma (Ytterberg y Jensen, 2010, Walsh y Jefferis, 2006, Prabakaran y col 2012). Como se mencionó

anteriormente la mayoría de las proteínas de interés producidas en plantas son direccionadas a la vía secretoria, debido a que requieren determinadas PTMs para ser funcionales, en este sentido hay que tener en cuenta que a pesar que la mayoría de las PTMs son altamente conservadas entre animales y plantas, existen importantes modificaciones específicas de plantas que deben ser tenidas en cuenta cuando se desea expresar una proteína recombinante (Twyman y col 2003).

En esta sección nos centraremos en algunas de esas modificaciones que generan un mayor impacto en la calidad de las proteínas recombinantes producidas.

3.1. Plegamiento oxidativo

La formación de puentes disulfuro resulta por la oxidación de los grupos tiol de dos residuos de Cys. En eucariotas, este proceso ocurre principalmente en el ER, aunque también puede ocurrir en mitocondrias y cloroplastos. Más del 90% de las proteínas sintetizadas en el ER poseen puentes disulfuro (Patil y col 2015, Okuda y col 2017) y este proceso se encuentra altamente conservado en proteínas relacionadas, remarcando la importancia biológica del mismo (Bosnjak y col 2014).

El plegamiento oxidativo es un proceso que ocurre co-traduccionalmente y la formación de enlaces disulfuro juegan un rol importante en la estabilización de la estructura nativa de la proteína y de complejos oligoméricos, teniendo un rol importante durante el plegado. El plegamiento oxidativo requiere de la acción de un miembro de las proteínas PDIs, una familia de enzimas ubicuas del ER, que cataliza la formación, isomerización y reducción de los puentes disulfuro, para asegurar el plegamiento correcto de las proteínas antes de su modificación y transporte (Tu y Weissman, 2004), el tiempo de acción de esta enzima puede prolongarse en presencia de la chaperona de la familia de Hsp70, BiP, una de las proteínas mayoritarias del ER, la cual es la principal encargada en el control de calidad, ensamblado y plegado de una gran variedad de proteínas. La clásica PDI es una enzima multifuncional que consiste de dos dominios tiorredoxina y dos dominios inactivos redox. En plantas superiores, se encontraron 10-20 miembros de la familia PDI, los cuales se dividieron en 6 subfamilias, A, B, C, L, M y S, siendo los miembros de la subfamilia L los únicos que comparten la distribución de dominios típica de las PDIs clásicas de humanos y levaduras (Yuen y col 2016). La evidencia actual sugiere que la diferencias estructurales y moleculares entre

las distintas PDIs serían vitales para determinar la función y especificidad de las mismas (Onda, 2013). Luego de la oxidación del sustrato, los residuos de Cys del sitio activo deben ser reoxidados. La vía más importante y estudiada del reciclado de PDI es mediante la enzima ER Oxidoreductin 1 (ERO1), la cual es capaz de formar puentes disulfuro *de novo* (Tu y Weissman, 2004).

A pesar de estas diferencias, son numerosos los ejemplos de proteínas heterólogas expresadas en plantas que adquieren una estructura tridimensional funcional por lo que los puentes disulfuros se han formado de una manera correcta (Tablas 1 y 2).

3.2. N-Glicosilación

La glicosilación hace referencia a la unión covalente de carbohidratos a una proteína. Es un proceso compartido por los tres dominios de la vida y una de las PTMs más comunes y complejas en células eucariotas. Más del 50% de las proteínas eucariotas se encuentran glicosiladas, y el 40% de las proteínas usadas en medicina son glicoproteínas (Dell y col 2010, Webster y Thomas, 2012).

La unión de carbohidratos a una proteína afecta de manera importante las propiedades fisicoquímicas de las mismas, como la estabilidad química, el plegamiento, protección contra degradación proteolítica y solubilidad, así como sus propiedades biológicas, tales como la inmunogenicidad, la actividad biológica, la velocidad de depuración y la interacción ligando-receptor (Gerasimova y col 2016, Webster y Thomas, 2012).

La N-glicosilación puede introducir considerable heterogeneidad mediante la generación de diferentes estructuras de glicanos a medida que la proteína es transportada por la vía secretoria. Como se mencionó, el perfil y naturaleza de los glicanos que presenta la glicoproteína (glicofoma) puede impactar en el plegado, funcionalidad e inmunogenicidad de las mismas. El perfil de glicofomas y la funcionalidad de las proteínas producidas variará dependiendo del sistema de expresión utilizado (Walsh y Jefferis, 2006), los N-glicanos típicos obtenidos al expresar glicoproteínas en células de mamíferos, humanas, insectos, levaduras y plantas se esquematizan en la figura 5.

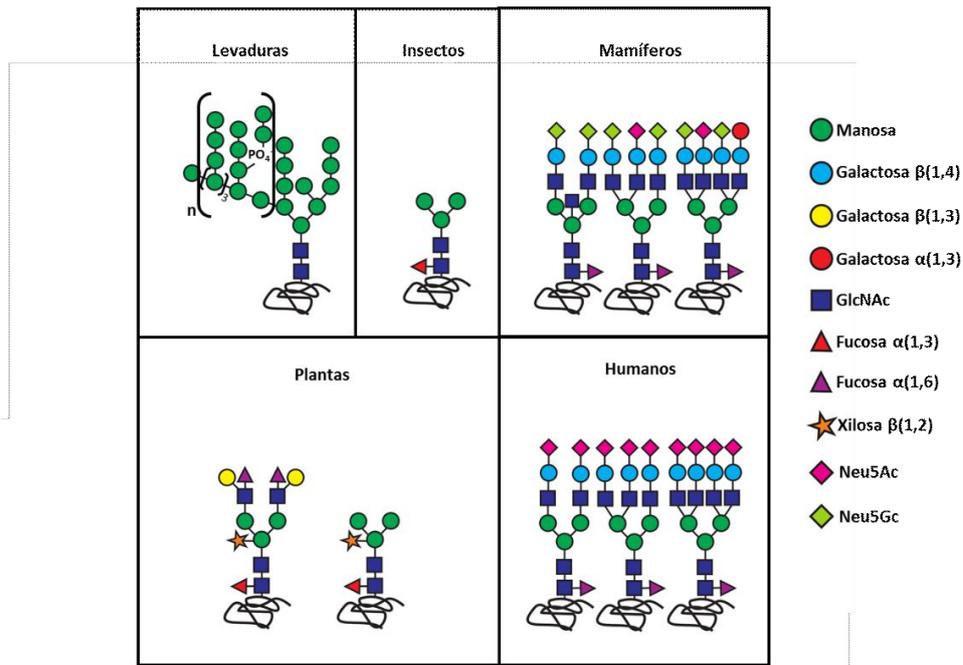


Figura 5. Perfil de N-Glicanos obtenidos en los diferentes sistemas de expresión

La N-glicosilación de proteínas es un proceso que se puede dividir en dos etapas (Figura 6), la primera se encuentra altamente conservada en eucariotas e inicia en el ER con la transferencia de un polisacárido precursor (Glc3Man9GlcNAc2), derivado de un lípido dolicol anclado a la membrana del ER, al polipéptido naciente. El precursor es adicionado al residuo de asparagina (Asn) del péptido específico Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico (Gerasimova y col 2016, Pattison y Amtmann, 2009, Helenius y Aebi, 2004). El N-glicano es modificado a medida que es transportado por la vía secretoria, estas modificaciones involucran el clivaje de los residuos de glucosa y manosa generando las glicofomas ricas en manosa Man9GlcNAc2 y Man8GlcNAc2 (Man9-Man8), presentes en todos los eucariotas (Lannoo y Van Damme, 2015, Gomord y col 2010).

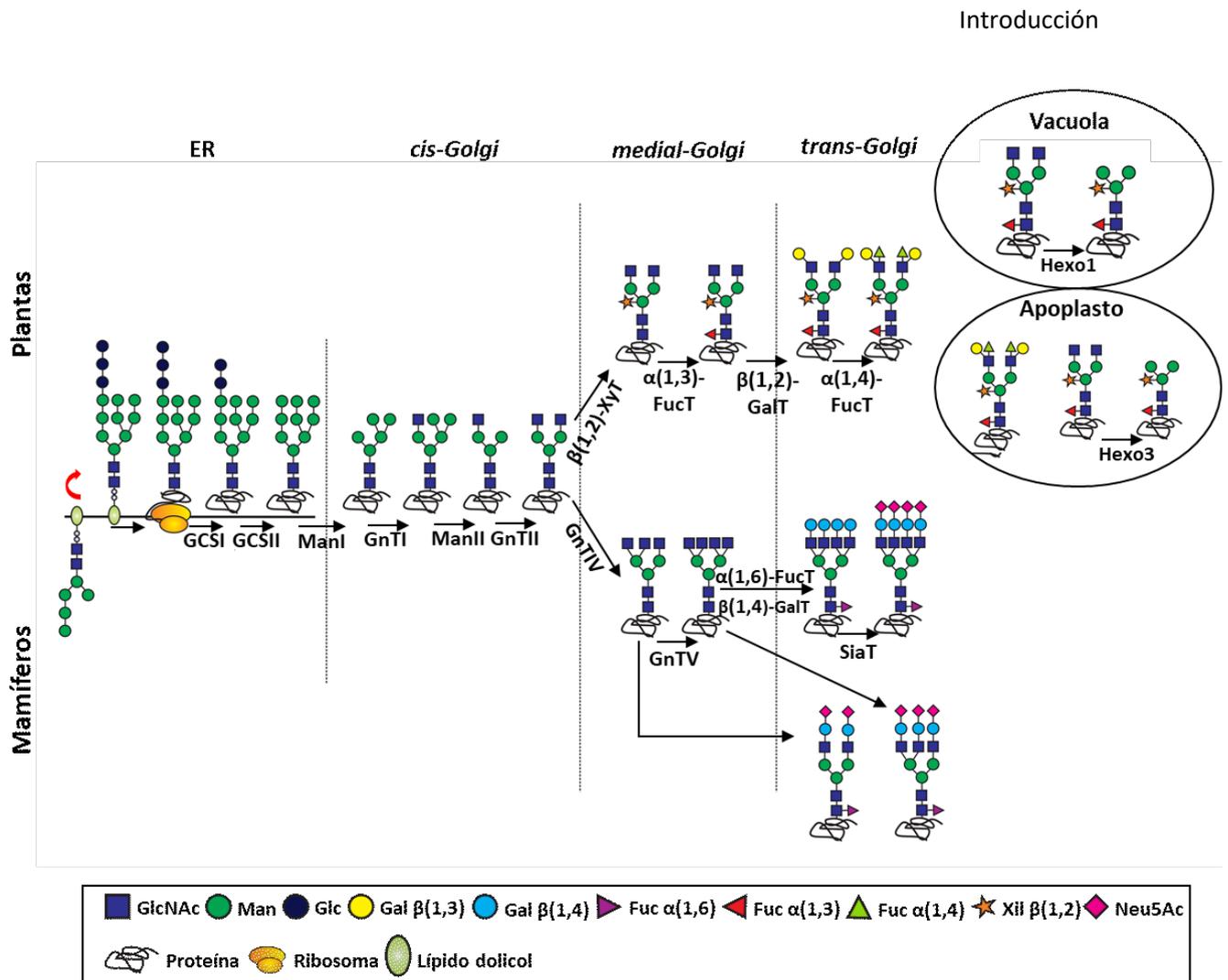


Figura 6. N-glicosilación en plantas y mamíferos. Un oligosacárido precursor ensamblado sobre un lípido dolícol es transferido a un residuo de Asn específico del péptido nascente. El N-glicano es procesado mediante la remoción de los residuos de glucosa y la mayoría de los residuos de manosa. Las diferencias en el procesamiento para generar los N-glicanos complejos en plantas y mamíferos ocurren en el aparato de Golgi. GCSI y -II: Glucosidasa I y II; ManI y -II: Manosidasa del Golgi I y II; GnTI, -II, -IV y -V: N-acetilglucosamiltransferasa-I, -II, -IV y -V; β(1,2)-XylT: β(1,2)-Xilosiltransferasa; α(1,3)-FucT: α(1,3)-Fucosiltransferasa; α(1,4)-FucT: α(1,4)-Fucosiltransferasa; α(1,6)-FucT: α(1,6)-Fucosiltransferasa; β(1,2)-GalT: β(1,2)-Galacosiltransferasa; β(1,4)-GalT: β(1,4)-Galacosiltransferasa; SiaT: α(2,6)-sialiltransferasa.

La segunda etapa ocurre en el Aparato de Golgi (GA, *Golgi apparatus*), organela a la cual son transportadas las glicoproteínas luego de pasar un “control de calidad” en el ER y donde éstas sufren cambios estructurales que dan lugar a la formación de glicanos complejos. Las modificaciones ocurridas en el cis- y medial-golgi se encuentran conservadas entre los diferentes eucariotas, mientras que las enzimas presentes en el trans-golgi varían enormemente entre los eucariotas (Gomord y Faye, 2004, Gerasimova y col 2016). En plantas, el oligosacárido es reducido a tres manosas terminales y posteriormente se inicia la incorporación de nuevos residuos glucosídicos por acción de las N-acetilglucosaminil-transferasas I y II (GNT I/II) que agrega una molécula de N-

acetilglucosamina (GlcNAc) en cada extremo de los dos brazos del glicano, formándose una estructura denominada biantenaria, iniciándose de este modo la biosíntesis de los N-glicanos complejos. Un rasgo específico de las glicoproteínas de plantas es el agregado de xilosa $\beta(1,2)$ y fucosa $\alpha(1,3)$ al armazón de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ catalizado por la $\beta(1,2)$ -xilosiltransferasa ($\beta(1,2)$ -XylT) y $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferasa ($\alpha(1,3)$ -FucT) (Strasser, 2016), procesos que ocurren principalmente en el medial- y trans-golgi. Estos glicanos son inmunogénicos para la mayoría de los animales de laboratorio y pueden causar la generación de anticuerpos específicos contra glicanos en humanos (Sourrouille y col 2008). La transferencia de xilosa $\beta(1,2)$ y fucosa $\alpha(1,3)$ puede ser seguida por la adición galactosa $\beta(1,3)$ en una o ambas antenas del N-glicano complejo, formando el motivo denominado epítipo de Lewis a (Le^a), este proceso es catalizado por la $\beta(1,3)$ -galactosiltransferasa ($\beta(1,3)$ -GalT). Posteriormente, la $\alpha(1,4)$ -fucosiltransferasa ($\alpha(1,4)$ -FucT) completa la biosíntesis del epítipo de Le^a .

Luego de su síntesis y maduración en el ER y GA, los N-glicanos complejos pueden sufrir modificaciones posteriores durante el transporte a su localización subcelular final (Webster y Thomas, 2012, Castilho y Steinkellner, 2012). Entre ellas, podemos mencionar la remoción de los azúcares terminales de los glicanos complejos formándose estructuras denominadas paucimanosídicas. Estos glicanos se han considerado típicos de vacuola (Gomord y col 2010), aunque también se encuentran en proteínas secretadas al apoplasto y hay ejemplos de proteínas heterólogas direccionadas a vacuola que no presentan estas estructuras (Liebminger y col 2011, Schneider y col 2015, Ocampo y col 2016b).

4. La vía secretoria en plantas

Como se mencionó previamente, muchas de las proteínas terapéuticas, diagnósticas y con aplicaciones industriales son producidas en la vía secretoria. En células vegetales, esta vía presenta características particulares que las distingue de la que tienen otras células eucariotas, siendo una red compleja de organelas especializadas en la síntesis, el transporte, la modificación y la secreción de proteínas y otras macromoléculas, integrando varias rutas dinámicas: la vía secretoria y la vía endocítica. Está constituida por varios compartimentos funcionalmente distintos: el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, la red trans-Golgi (TGN, *trans Golgi*

network)/endosomas tempranos (EE, *early endosomes*), membrana plasmática y, además, las células vegetales contienen tres tipos de vacuolas: vacuola de reserva, vacuola lítica (LV, *lytic vacuole*) y la vacuola central (CV, *central vacuole*) y compartimientos prevacuolares/cuerpos multivesiculares (PVC, *prevacuolar compartment/MVB, multivesicular bodies*) (Surpin y Raikhel, 2004), las membranas de los cloroplastos y las mitocondrias no pertenecen a este sistema (Figura 7).

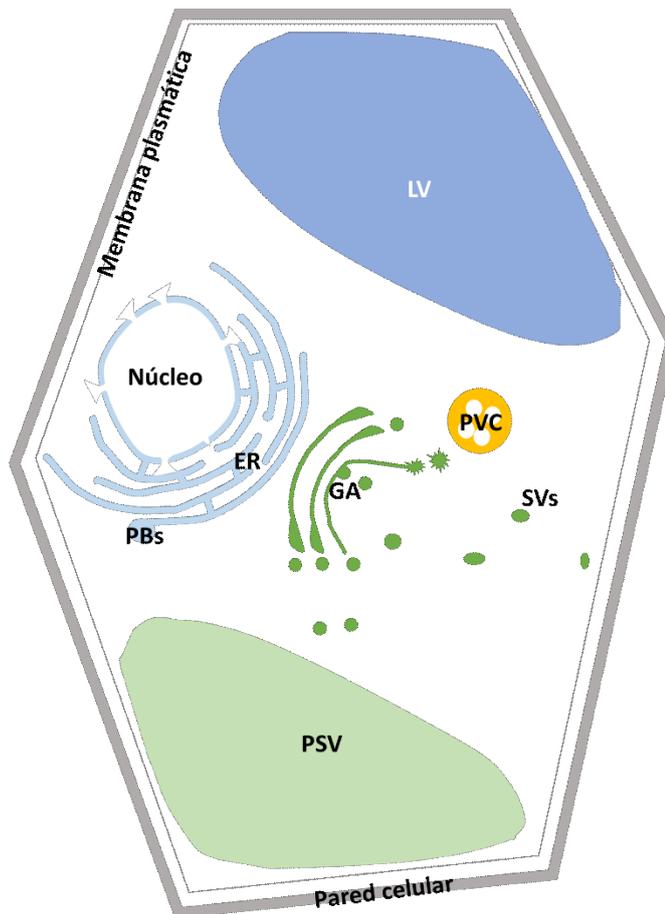


Figura 7. Sistema de endomembranas general en la célula vegetal.

Aparato de Complejo de Golgi (GA, *Golgi apparatus*), Retículo endoplásmico (ER, *Endoplasmic Reticulum*), Cuerpos Proteicos (PB, *Protein body*), Vacuola de almacenamiento de proteínas (PSV, *Proteins storages vacuols*), compartimiento prevacuolar (PVC, *Prevacuolar compartment*) y Vesículas secretorias (SV's, *Secretary vesicles*).

El ER consiste en una red tridimensional de tubos y hojas interconectadas entre sí y que comparten el mismo espacio interno, estando distribuido en el citoplasma y a continuación de la envoltura nuclear. Esta organela está encargada de la síntesis, modificación y subsiguiente transporte de las proteínas correctamente plegadas al GA (Hawes y col 2015). En plantas, el GA presenta funciones y rasgos similares al de los mamíferos y, a su vez, características únicas. La mayor diferencia es estructural, ya que

en células de mamíferos su posición es perinuclear y casi estacionaria, mientras que en plantas se encuentra dividido en apilamientos individuales, recibiendo su denominación respecto a su proximidad al ER. En este sentido el GA se denomina *cis*-Golgi al más cercano al ER, seguido del Golgi-*medio* y el *trans*-Golgi, finalmente se encuentra la Red del *trans*-Golgi. En general, todas estas cisternas se consideran independientes funcionalmente ya que tanto su morfología como actividad enzimática cambia gradualmente a lo largo de las mismas (Ito y col 2014). Por otro lado, el PVC/MVB son organelas rodeadas por una única membrana y que poseen un rol en el transporte de proteínas hacia la vacuola, actuando como un compartimento intermediario entre el TGN y esta organela (Cui y col 2016).

Siguiendo con la descripción de la vía secretoria, encontramos a las vacuolas. El número y tamaño de las vacuolas depende del tipo de célula y de su estado de desarrollo. Una única vacuola central puede ocupar hasta el 80% del volumen celular. En plantas, las vacuolas son esencialmente organelas multifuncionales, siendo un compartimento clave, pues intervienen en un gran número de funciones esenciales como, por ejemplo, el mantenimiento de la turgencia, de la homeostasis protoplasmática y el almacenamiento de metabolitos secundarios y proteínas que al ser degradadas son utilizadas como fuente de carbono, nitrógeno y azufre, tanto para los procesos de crecimiento como de desarrollo de la planta (Marty, 1999). Las plantas presentan al menos dos tipos de vacuolas: vacuolas líticas y de reserva. Aunque una de las formas de distinguir a las vacuolas era mediante el uso de diferentes TIPs (*tonoplast intrinsic proteins*), gamma TIP para la LV y alfa/delta TIP para las PSV (Neuhaus y Rogers, 1998), a pesar de que se ha demostrado que su presencia varía entre las distintas especies (Bethke y Jones, 2000) y en los diferentes estadios de desarrollo (Gattolin y col 2010). Las LV son encontradas en tejidos vegetativos, poseen pH ácidos y contienen enzimas hidrolíticas en abundancia, se cree que las LV son análogas a los lisosomas de mamíferos y a la vacuola de levaduras y que intervienen en los procesos de degradación en células vegetativas. En contraste, las PSV poseen pH más elevados que las LV y predominan en tejidos de reserva (cotiledones y endosperma de semillas), así como en tejidos vegetativos en plantas adultas (corteza, vainas, hojas), sirven principalmente como sitio de almacenamiento de proteínas y minerales (Vitale y Raikhel, 1999). Aunque inicialmente se creía que las PSV eran típicas de semilla, la coexistencia de LV y PSV en

una misma célula fue descrita en células de punta de raíz de arveja (Paris y col 1996), luego en aleurona, en semillas de cereales (Swanson y col 1998) y en células de mesófilo de hoja de tabaco (Di Sansebastiano y col 1998). En cambio, en algunas especies como por ejemplo *arabidopsis* se postula la existencia de una sola clase de vacuolas (Gattolin y col 2010). La vacuola central híbrida, encontrada en la mayoría de las células de tejidos diferenciados se generaría por fusión de LV y PSV y poseería características funcionales de ambos compartimientos, conteniendo proteínas digestivas y de reserva. En adición a las LV y PSV, un tercer tipo de vacuola ha sido descrita en *Arabidopsis*. Durante la senescencia de la hoja, una vacuola asociada a senescencia de menor tamaño y que contiene agregados se forma *de novo*. Esta vacuola se caracteriza por una elevada actividad proteasa cisteínica y menores pH que las LV (Otegui y col 2005).

4.1. Transporte de proteínas en la vía secretoria

La mayoría de las proteínas que son transportadas a través de la vía secretoria se sintetizan como preproteínas. En plantas y otras células eucariotas, las proteínas son direccionadas al ER por un péptido señal (SP, *signal peptide*) N-terminal (pre-región). Estos SP no poseen una secuencia definida, pero suelen exhibir un diseño conservado, constituido por una región N-terminal cargada positivamente, una región central hidrofóbica y un extremo C-terminal más polar, además de un sitio de clivaje (Faye y col 2005, Gomord y Faye, 2004). En términos prácticos, los SP son intercambiables y, en muchos, casos la señal propia de la proteína heteróloga es capaz de direccionarla eficazmente al ER y es reconocida y clivada correctamente por la peptidasa de la planta, generando la proteína madura activa (Gomord y Faye, 2004). La secuencia SP es clivada ni bien ingresa al lumen del ER, siendo esta remoción esencial para el correcto plegado del dominio N-terminal. Únicamente las proteínas correctamente plegadas pueden abandonar el ER. El transporte desde el ER hacia el cis-GA es mediante las vesículas COPII (transporte anterógrado), estas vesículas se forman por polimerización del complejo de proteínas solubles de cubierta (COPs, *coat complex proteins*) en los sitios de salida de la membrana del ER (ERES, *endoplasmic reticulum exit sites*), mientras que las vesículas COPI transportan a aquellas proteínas no han alcanzado su estructura nativa o proteínas residentes del ER desde el cis-GA al ER (transporte retrógrado). Una vez en el GA el paso del cis, al medio y trans es explicado a través de dos modelos diferentes: el modelo del

transporte vesicular o bien el modelo de maduración de la cisterna (Alberts y col 2002). La vía seguida por una proteína dentro del sistema de endomembranas depende de la interacción entre secuencias de direccionamiento presentes en la proteína y la maquinaria de direccionamiento que reconoce estos motivos (Xiang y col 2013). Aquellas proteínas que carecen de otras señales de direccionamiento siguen un camino conocido como *default* terminando en la secreción de la proteína. En cambio, si la proteína es de membrana suele poseer un dominio transmembrana el cual la ancla al sistema de endomembranas (Vitale y Raikhel, 1999). Por otro lado, aquellas proteínas cuyo destino final es la vacuola, presentan al menos una de las siguientes señales de direccionamiento vacuolar (VSS, *vacuolar sorting signal*): señales secuencia-específica (ssVSS, *specific signal*), secuencias C-terminales (ctVSS, *C-terminal signal*), y/o s físicos (psVSS, *physic signal*) (Matsuoka, 1999, Vitale y Raikhel, 1999). Los ssVSS poseen la secuencia conservada NPIXL o NPIR, funcionan con independencia de su posición molecular, aunque se localizan generalmente en el extremo N-terminal y la presencia del residuo Leu o Ile son esenciales para el direccionamiento (Matsuoka, 1999). Se considera que están implicados en el direccionamiento a la LV como en el caso de la esporamina y la aleuraina de cebada (Nakamura y Matsuoka, 1993). También se han descrito ssVSS funcionales en proteínas de reserva como en el caso de la ricina (Frigerio y col 2001b). Los ctVSS se caracterizan por no poseer similitud en su secuencia ni longitud, siendo su única similitud la presencia de aminoácidos hidrofóbicos y que deben encontrarse accesibles en el extremo C-terminal, más aún, adición de aminoácidos en este extremo causa que la proteína sea secretada (Jolliffe y col 2005, Matsuoka, 1999). Un ejemplo de estas señales de direccionamiento es la secuencia AFVY presente en la faseolina (una glicoproteína de reserva del poroto común). La delección de estos aminoácidos del propéptido suprime el direccionamiento vacuolar, causando que una fracción de las moléculas de faseolina Δ AFVY sean secretadas (Frigerio y col 2001a, Frigerio y col 1998).

Existen dos familias de proteínas las cuales han sido propuestas como receptores implicados en el transporte de proteínas cargo hacia la vacuola y cuya interacción con distintos VSSs ha sido demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* (Miao y col 2006, Shimada y col 2003). Por un lado, se describen los VSRs (*vacuolar sorting receptors*) que poseen motivos similares al factor de crecimiento epidérmico (*EGF-like motifs*) (Ahmed y col

2000) y, por otro lado, los RMR (*receptor-transmembrane sequence-RING-H2*, *RING*, *Really Interesting New Gene Zinc Finger Motif*) que contiene un motivo dedos zinc (Jiang y col 2000). La funcionalidad y participación de estos receptores en el transporte a vacuolas es objeto de controversias habiéndose propuesto diferentes mecanismos de tránsito. La evidencia actual sugiere que existen rutas alternativas de transporte a vacuola, las cuales están siendo caracterizadas y, a su vez, en muchos casos se presentan interconexiones intrincadas entre estas rutas, lo cual complica la interpretación de los resultados (Di Sansebastiano y col 2017).

4.1.1. Transporte de proteínas a la vacuola por la vía dependiente del GA

Según el modelo más aceptado el transporte a vacuolas líticas es mediado por vesículas CCV (*clathrin coated vesicles*) que se originan en el TGN y se cree que depositarían su contenido dentro de los compartimientos pre-vacuolares PVC/MVB y en las que intervendría homólogos del receptor de direccionamiento vacuolar, como el receptor de arveja (*Pea sativum*) BP80/ *Arabidopsis thaliana*-VSR1, que reconoce ssVSS como por ejemplo NPIRL/NPIXL en la proteína a ser transportada (Matsuoka and Neuhaus 1999, Vitale and Raikhel, 1999, Ahmed *et al.*, 2000) y que se localizarían en el Golgi y post-Golgi. Múltiples evidencias apoyan este modelo, con ensayos recientes demostrando que la unión del ligando al VSR ocurriría principalmente en las cisternas del GA (Gershlick y col 2014). Sin embargo, este modelo es objeto de controversias y se han propuesto diferentes modelos de direccionamiento y tráfico divergentes, existiendo evidencia que la interacción con el cargo empezaría en el ER (Niemes y col 2010a) y terminaría en el *trans*-Golgi (Kunzl y col 2016), apoyando el modelo no clásico de transporte a vacuolas propuesto recientemente (Robinson y Pimpl, 2014).

En semillas en desarrollo de dicotiledóneas como por ejemplo arveja, se describieron que las vesículas densas (DVs, *dense vesicles*) que emergen del complejo de GA *cis*- o medio y transportan las proteínas de reserva a PSV. Estas vesículas son ligeramente mayores que las CCV y carecen de VSRs y en su lugar poseen RMRs (Vitale y Raikhel, 1999, Hinz y col 1999, Hohl y col 1996, Vitale y Hinz, 2005, Dhonukshe y col 2007). Hay dos hipótesis para explicar el destino final de las DVs, la más simple establece que se fusionarían directamente al PSV (Liu y col 2013), mientras que la otra propuesta establece que formarían los MVB que actuarían como el compartimiento prevacuolar

de reserva (Shen y col 2011). Teniendo esto en cuenta, si bien se necesita más información sobre el destino final de las DVs, las similitudes existentes entre estas y las PVC es interesante y existe cada vez más evidencia que muestra la interconexión de las DVs y PVCs, lo cual representaría un punto de convergencia entre las vías de transporte a LV y PSV (Hinz y col 2007, von Lupke y col 2008).

4.1.2. Vía de transporte de proteínas a vacuola independientes del GA

En semillas en desarrollo de zapallo se encuentran las vesículas PAC (*precursor-accumulating*) que transportan precursores de proteínas de reserva directamente desde el ER a PSV, estas vesículas están recubiertas de ribosomas (Hara-Nishimura y col 1998). Como las PAC poseen VSRs como el PV72 y contienen glicoproteínas derivadas de GA se ha sugerido que las vesículas PAC podrían reclutar selectivamente componentes provenientes del GA (Hara-Nishimura y col 1998, Shimada y col 2002). En este sentido, el origen de las vesículas PAC y la relación del GA con esta vía es todavía poco claro (Pimpl y col 2006).

Otros tipos de transporte desde el ER hacia la vacuola han sido reportados. Uno de ellos involucra cuerpos protéicos (PBs, *protein bodies*), los cuales difieren en tamaño y forma de las PACs, sin embargo, su contenido es muy similar. Se han descrito dos tipos de PBs. En zapallo, la proteína gluteína se acumula en PB de tipo II (PBII) y luego es transportada a la vacuola, mientras que la prolamina se deposita en PB de tipo I (PBI), un subdominio del ER (Di Sansebastiano y col 2017). A su vez, únicamente en plantas, las proteínas residentes en LV pueden llegar a este compartimento a través de una vía que no pasa por el GA, por medio de PBs que se desprenden del ER y que actúan como compartimentos intermedios (Pereira y col 2014, Xiang y col 2013, Hara-Nishimura y col 2004). Recientemente se ha propuesto que, en hojas, los PBs no se desprenden del ER, sino que interaccionan con este de manera dinámica intercambiando proteínas (Saberianfar y col 2016).

Un resumen de las diferentes vías identificadas por las cuales las proteínas pueden alcanzar la vacuola se muestra en la figura 8.

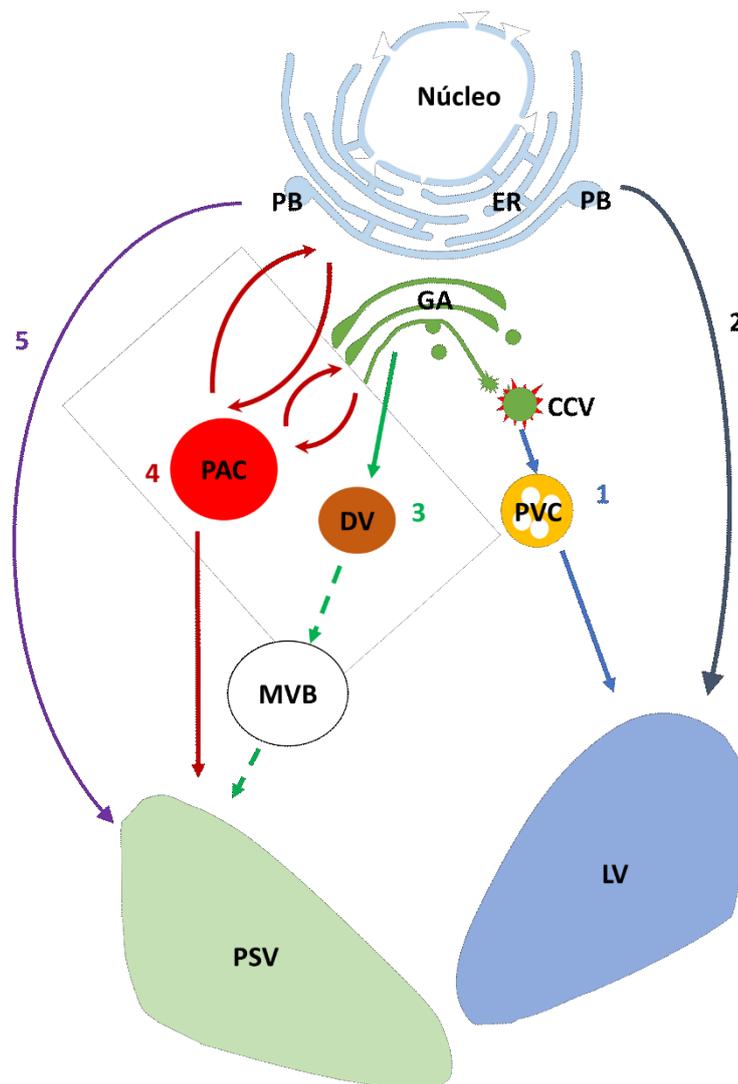


Figura 8. Vías de transporte a vacuolas.

1. Ruta hacia LV mediada por el GA. En esta ruta se distinguen el modelo clásico de transporte a vacuolas, en el cual el VSR reconoce a su ligando en el GA y el modelo no clásico según el cual dicha unión ocurriría en el ER.
2. Vía de transporte a vacuola independiente del Sistema COPII y del GA la cual estaría mediada por PBs.
3. Vía hacia PSV desde el GA mediada por DV, las cuales podrían formar los MVBs.
4. Ruta hacia la vacuola mediada por vesículas PAC, las cuales podrían desprenderse del ER o del GA, hacia PSV.
5. Ruta directa desde el ER hacia PSV mediada por PBs observada en semillas

5. subfamilia de factores de transcripción AFL

Los genes **ABI3**, **FUS3** y **LEC2** forman parte de la subfamilia AFL y junto con **LEC1** son claves en la síntesis de proteínas de reserva (Verdier y Thompson, 2008). La red conocida como **LEC1/AFL** (LAFL) regula la embriogénesis, maduración, dormancia y germinación de la semilla (Carbonero y col 2017, Devic y Roscoe, 2016). **LEC1** y **LEC2** se expresan en etapas tempranas del desarrollo de la semilla (morfogénesis) mientras que **FUS3** y **ABI3** lo hacen en etapas tardías (maduración) (Figura 9). Los genes LAFL han sido asociados a incrementos en la síntesis de triglicéridos y proteínas de reserva de semilla, biosíntesis de antocianinas y represión de genes involucrados en la movilización de reservas tales como amilasas y proteasas (Carbonero y col 2017).

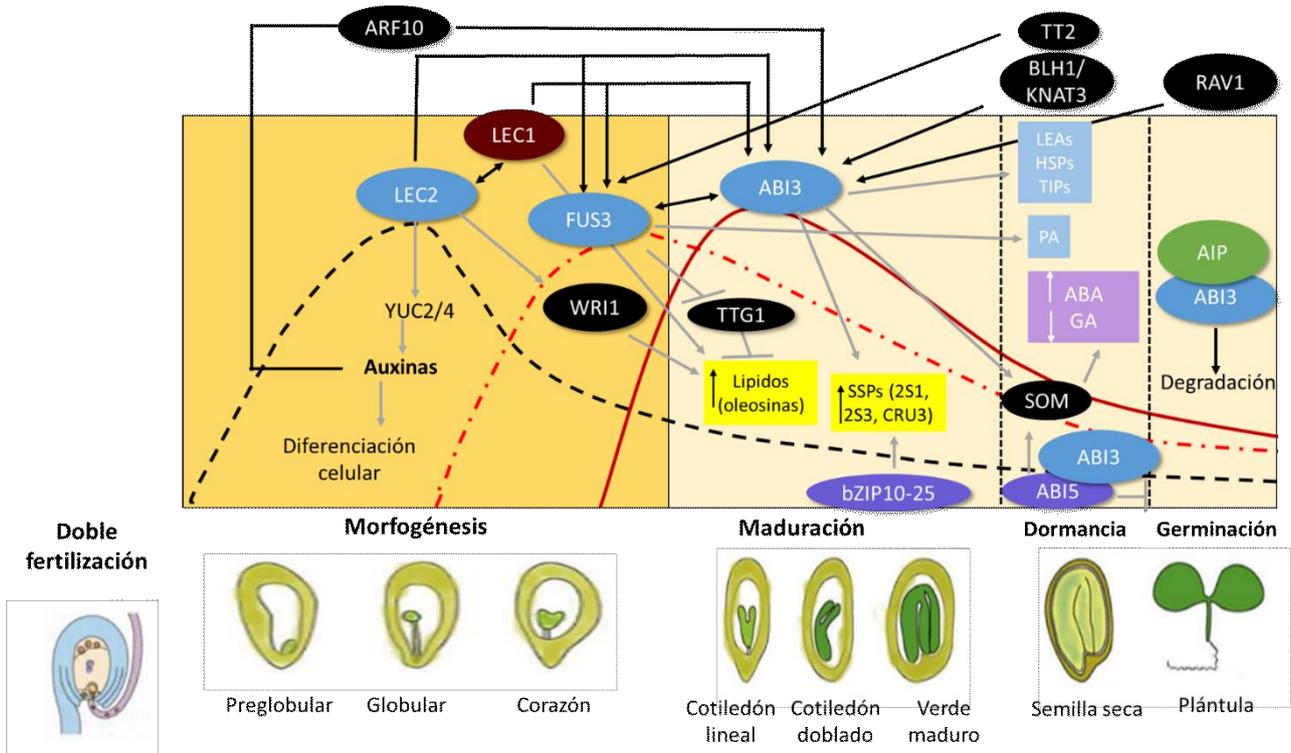


Figura 9. Modelo propuesto para la regulación transcripcional de los genes de semilla por la red AFL (ABI3/FUS3/LEC2) durante la embriogénesis, maduración, dormancia y germinación de *Arabidopsis*.

Las curvas muestran los patrones de expresión temporal de **LEC 2**, **FUS3** y **ABI3** en las distintas etapas de desarrollo. Los niveles de **LEC2** se incrementa durante la morfogénesis mientras que **FUS3** y **ABI3** se expresan durante la etapa de maduración. Durante la dormancia y germinación la red AFL es reprimida. **LEC1** se expresa también en etapas tempranas y potencia la acción de **LEC2** y **ABI3**. La red AFL estimula la síntesis de lípidos y proteínas de reserva durante la maduración de la semilla. **AIP**, Proteína de interacción con **ABI3**; **ARF10**, factor de respuesta a axina 10; **HSPs**, proteína de shock térmico; **LEAs**, proteínas abundantes en embriogénesis tardía; **PA**, proantocianinas; **SOM**, **SOMNUS**; **SSPs**, proteínas de reserva de semilla; **TTG1**, **Transparent Testa Glabra 1**; **TT2**, **Transparent Testa 2**; **WRI1**, **WRINKLED1**; **YUC2/4**, flavin monooxygenase-like 2 o 4.

Los factores de transcripción AFL se caracterizan por contener el dominio de unión a DNA exclusivo de plantas B3 (Figura 10A), que fue originalmente descrito en VP1 (*Viviparous-1*, el ortólogo de maíz de ABI3) (Carbonero y col 2017). Este dominio reconoce el motivo Sph (TCCATGCAT) presente en las regiones regulatorias de los genes blancos (Suzuki y col 2014, Suzuki y col 1997). El elemento central de la secuencia de DNA reconocida por el dominio B3 es denominado RY (CATG) y se encuentra conservado en los genes AFL, sin embargo, su extensión e identidad es variable, por ejemplo FUS3 reconoce la secuencia CGCATGCG y LEC2 la secuencia GCATGC (Baud y col 2016). En la Figura 10B se muestra como los distintos factores LAFL interactúan para estimular la expresión de gen de la oleosina (Baud y col 2016) y la proteína de reserva 2S3 (Kroj y col 2003) de *Arabidopsis thaliana*. ABI3/VP1 posee además del dominio B3, en la región N-terminal el dominio COAR (*Co-Activator/Co-Repressor*) (Figura 10A), que tiene una región ácida (A1) y las regiones básicas B1 y B2 (Jia y col 2013, Carbonero y col 2017) las cuales median una vía de señalización de ácido abscísico a través de la interacción física con proteínas bZIP relacionadas con ABI5 (Suzuki y col 2014). Los dominios A1 y B1 se perdieron en LEC2 y FUS3 (Carbonero y col 2017).

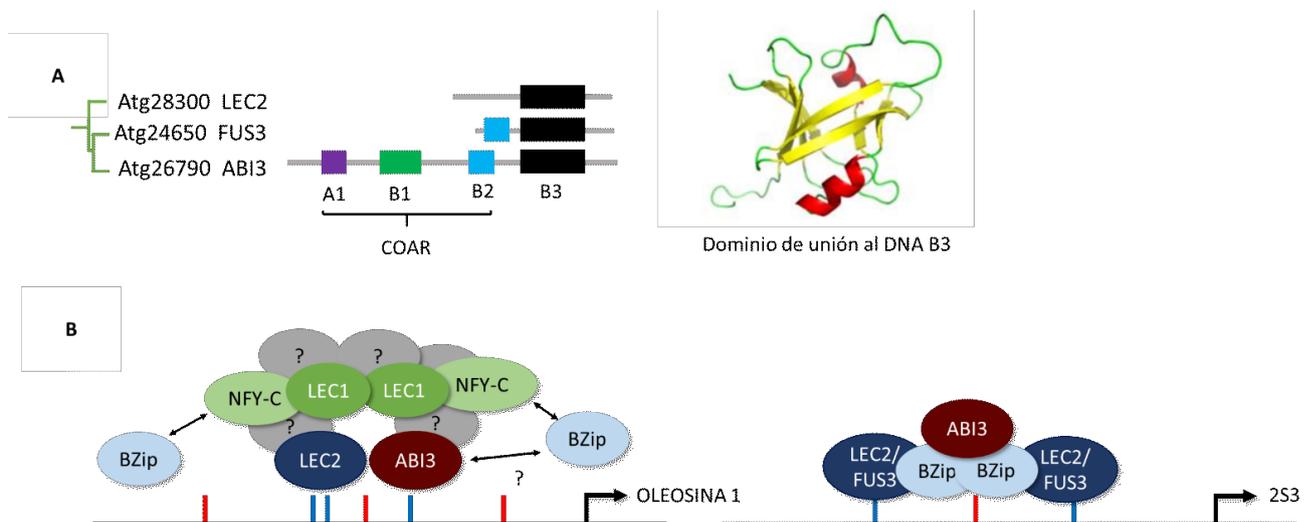


Figura 10. Estructura general de los genes AFL (ABI3/FUS3/LEC2) y el reconocimiento de secuencias regulatorias presentes en promotores específicos de semilla.

A: Estructura general de los genes AFL de *Arabidopsis*. El dominio B3 de ABI3/*Viviparous 1* se une específicamente al motivo Sph presente en promotores específicos de semilla. La región N-terminal de ABI3 posee el dominio COAR (*Co-Activator/Co-Repressor*) con una región ácida (A1) y dos regiones básicas B1 y B2. FUS3 y LEC2 carecen de los dominios A1 y B1.

B: Modelo que muestra la regulación transcripcional de los promotores de la oleosina 1 y la proteína de reserva 2S3 de *Arabidopsis* por la red LAFL. Barras azules motivos RY-like (RYL); barras rojas, motivos G-box like (GBL). El dominio RY-like posee un elemento central (CATG) que está conservado en los genes AFL, pero la extensión e identidad de la secuencia reconocida es variable.

LEC1 es un factor de transcripción del tipo NF-YB, que estimula la síntesis de LEC2 y ABI3 pero no de FUS3 (Boulard y col 2018). Esto se debe a que LEC1 interactúa con una secuencia del dominio B2 que está conservada en los factores de transcripción LEC2 y ABI3 pero que ha sufrido mutaciones en el gen FUS3 (Boulard y col 2018). LEC1 posee funciones más amplias que la regulación de la red AFL y actúa sobre varios sets de genes que participan en las distintas etapas del desarrollo de la semilla y también en la síntesis de ácido giberélico y abscísico (Jo y col 2019). Asimismo se ha demostrado que LEC1 sería un factor de transcripción pionero debido a que promueve la diferenciación celular por reprogramaciones epigenéticas a través de modificaciones de la cromatina y metilación del DNA (Tao y col 2017).

Los genes AFL se encuentran muy extendidos en el reino vegetal encontrándose por ejemplo en algas verdes unicelulares y pluricelulares, en gimnospermas, angiospermas, dicotiledónea y monocotiledóneas y otros organismos fotosintéticos. En angiospermas poseen un rol clave en el desarrollo de semillas (Carbonero y col 2017). La función en algas y otros organismos fotosintéticos aún no ha sido dilucidada (Carbonero y col 2017). El *cluster* ABI3/VP1 existe en todas las plantas terrestres. FUS3 surgió por duplicación génica y está presente en angiospermas y gimnospermas. LEC2 habría surgido por duplicación génica de FUS3 y se encuentra tanto en las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas que poseen al menos dos formas de este gen (Carbonero y col 2017).

La activación de la red AFL es desencadenada por diversos factores que actúan en las distintas etapas del desarrollo de la semilla. La sobreexpresión de AGAMOUS15 (AGL15) produce un incremento de LEC1 y LEC2 y subsecuentemente de ABI3, FUS3 y LEC2 (Figura 11) (Devic y Roscoe, 2016). MYB118 es un activador de AFL en la transición del estado vegetativo a embriogénico, su acción resulta en un incremento de LEC1 y en la acumulación de lípidos de reserva en tejidos vegetativos (Devic y Roscoe, 2016). La expresión de CHR5 en etapas tempranas de desarrollo activa la red AFL. CHR5 se asocia a los promotores de ABI3 y FUS3. A través de mutaciones en DCL1 se confirmó también el rol de miRNAs en la inducción del programa de maduración. Evidencias indirectas sugieren la participación del miR156 durante la embriogénesis el cual a través de la degradación de SPL10 y SPL11 evitaría la expresión precoz de los genes LEC2 y FUS3 que intervienen en la maduración. En la transición de morfogénesis a maduración, se favorece la transcripción de SPL10 y SPL11 lo que permite superar la represión de la

expresión de LEC2 y FUS3. La transición de morfogénesis a maduración, también está controlada por miR166 cuyo blanco es PHAVOLUTA (PHV) y PHABULOSA (PHB), que actúan como activadores de LEC2. FUS3 interviene retro-regulando la red de activación siendo AGL15, MYB118 y miRNA156 sus blancos (Devic y Roscoe, 2016).

La transición al estado vegetativo requiere de la eficiente represión de la red AFL. Esto ocurre por medio de un fuerte control epigenético mediado por el silenciamiento transcripcional mediante la marca represora H3K27me3 en la cromatina. VAL/HSIB3, junto con co-represores reclutan al complejo histona desacetilasa (HDACs, *histone deactylases*) en los genes blancos conteniendo motivos RY lo que produce el paso a cromatina inactiva transcripcionalmente bloqueando la red AFL (Devic y Roscoe, 2016). En este proceso también intervienen PRC (*Polycomb Repressive Complex*) que actúan sobre las proteínas que remodelan la cromatina. Tanto PRC1 como PRC2 reprimen la expresión de la red AFL. Otras proteínas que intervienen en la represión de la red AFL son ASIL1 y SCL15. FUS3 también lo hace a través de su interacción con VAL1, PICKLE y la subunidad RING1b de PRC1 en ejerciendo de esta manera una retroalimentación negativa (Devic y Roscoe, 2016).

Los factores de transcripción LEC1 y LEC2, como así también WUSCHEL, BABY BOOM, AGL15 y PLETHORA5 favorecen la embriogénesis somática cuando son sobre-expresados. La embriogénesis somática además es desencadenada por reguladores epigenéticos como PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) y HDACs (Kadokura y col 2018).

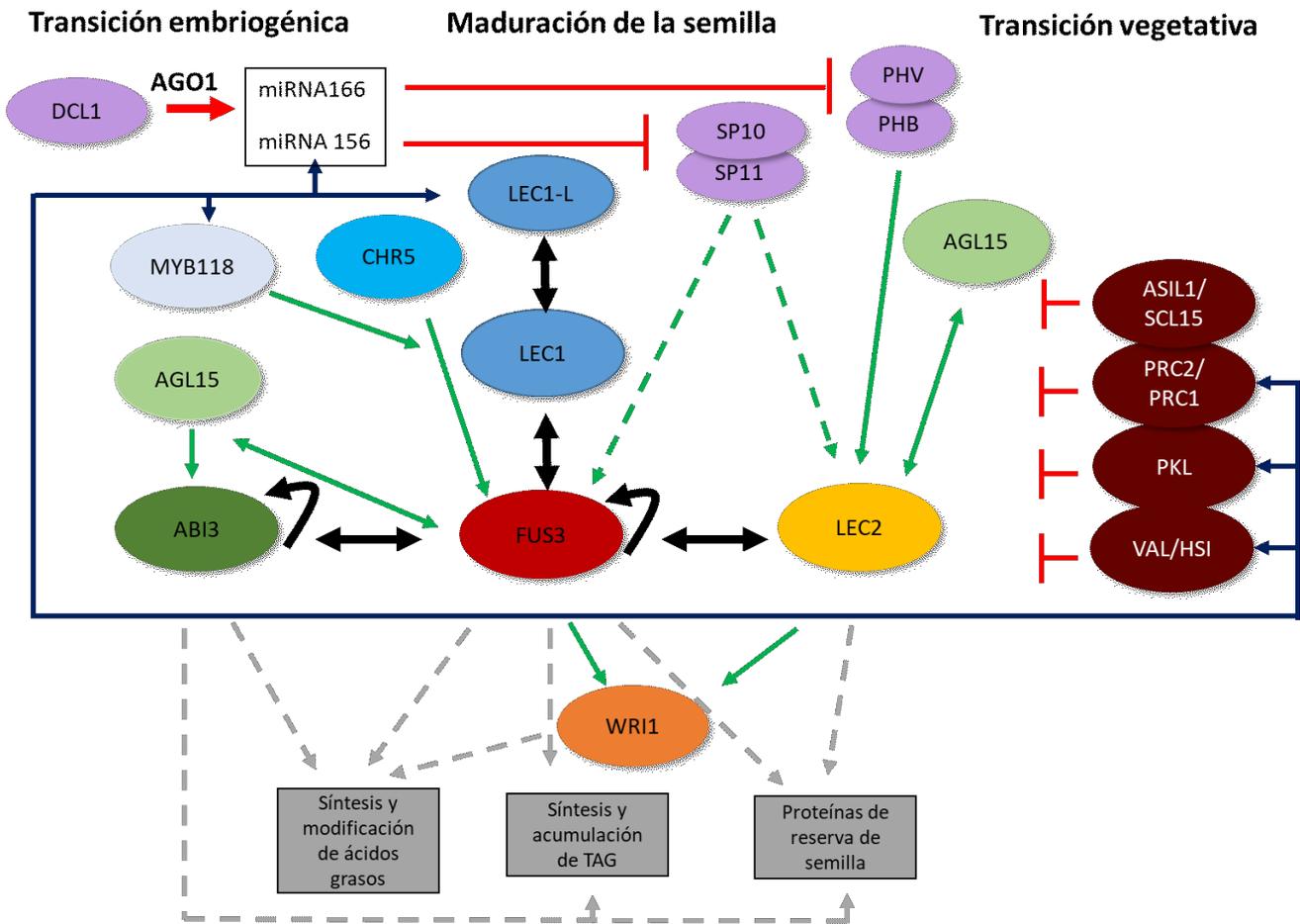


Figura 11. Regulación transcripcional y postranscripcional de la red AFL durante el desarrollo del embrión y transición al crecimiento vegetativo de Arabidopsis.

Las flechas negras indican control propio y mutuo y la representación gráfica de los factores no implica jerarquía de las interacciones génicas. Las flechas verdes enteras indican activación de la red, mientras que las verdes punteadas potencial activación. Las flechas grises indican retroalimentación, mientras que las grises punteadas activación de genes relacionados a las reservas. Por último las flechas con forma de T indican represión o silenciamiento. ABSCISSIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3), FUSCA3 (FUS3), LEAFY COTYLEDON1 (LEC1) LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2), AGAMOUS15 (AGL15), CHR5 (Chromodomain, Helicase and DNA-binding CHD1), VAL/HSIB3 factores B3 represores. Polycomb Repressive Complexes (PRC) AGL15 y MYB118 son activadores de la red AFL. WR1 = WRINKLED1 es un factor específico de tejido que activa la síntesis de ácidos grasos. TAG = Triacylglycerol.

A pesar del fuerte control epigenético, transcripcional y post-transcripcional de la red AFL la expresión ectópica de un único AFL como por ejemplo LEC2 puede inducir la síntesis de reservas en hojas (Santos Mendoza y col 2005). Diversas publicaciones muestran que la expresión ectópica de LEC2 modifica las características de la vacuola central de la hoja generando vacuolas más pequeñas del tipo de las PSV encontradas en semilla (Feeney y col 2013c, Feeney y col 2013a), estrategia ha sido descrita como de

estabilización por direccionamiento a PSV inducidos en tejidos vegetativos (Saberianfar, 2018).

LEC2 y otras proteínas AFL son reguladores maestros que promueven procesos metabólicos que requieren de un mayor suministro de energía y desarrollo de la vía secretoria. Este tipo de cambios en otros sistemas de expresión se logra por sobreexpresión por ejemplo de XBP que interviene en la diferenciación de una célula a profesional secretoria (Shaffer y col 2004). En células vegetales, estrategias de ingeniería de la capacidad de secreción aún no han sido publicadas, aunque el uso de ortólogos de plantas de XBP ha sido propuesto como una alternativa (Gomord y col 2013). A nivel de aplicación biotecnológica, se puede remarcar el uso del gen LEC2 para aumentar los niveles y generar el cambio del patrón de triglicéridos en hojas de tabaco, con la finalidad de obtener biocombustibles (Andrianov y col 2010), sin embargo, su uso en aumento de los rendimientos para producir proteínas recombinantes no ha sido informado.

Hipótesis y Objetivo

Hipótesis y objetivos

Los antecedentes descritos anteriormente muestran la importancia de los sistemas de expresión basados en plantas para la producción de proteínas foráneas. En particular si nos focalizamos en la síntesis de proteínas en la vía secretoria surgen algunas cuestiones vinculadas al funcionamiento de la misma, a las modificaciones postraduccionales y factores que afectan la estabilidad que se conocen escasamente y que deben ser estudiadas en más detalle

Por lo tanto, teniendo en cuenta:

1. La inestabilidad de las proteínas heterólogas en el apoplasto.
2. La existencia de vacuolas de naturaleza no hidrolíticas como los PSV y de vacuolas de naturaleza intermedia como la vacuola central.
3. La presencia de varias vías de transporte a vacuolas en células vegetales.
4. La escasa información sobre el proceso de N-glicosilación de proteínas vacuolares y la posterior modificación de los N-glicanos en vacuolas.
5. Que la producción de proteínas recombinantes en la vía secretoria de todos los sistemas de expresión está limitada por la capacidad de plegamiento y transporte.
6. Que las células que integran el embrión y endosperma constituyen ejemplos de células secretorias profesionales por su gran capacidad de sintetizar y almacenar proteínas y triglicéridos.

Se planteó como primera hipótesis de este trabajo que la expresión de una glicoproteína vacuolar modelo, como por ejemplo una inmunoglobulina, sería de utilidad para analizar el funcionamiento de la vía de transporte a vacuolas y explorar las posibles aplicaciones biotecnológicas de esta estrategia de direccionamiento.

La segunda hipótesis fue que la sobreexpresión de factores de transcripción involucrados en el desarrollo de la semilla tendrían la capacidad de estimular el desarrollo de la vía secretoria, lo que permitiría mejorar el plegamiento de las proteínas foráneas, su transporte a lo largo de la vía secretoria y también incrementar su estabilidad.

Para contrastar esta hipótesis se optó por sintetizar en células vegetales versiones vacuolares del anticuerpo monoclonal 14D9 que es una inmunoglobulina murina de tipo gamma 1 que cataliza la transformación estereo selectiva de enoles quirales (Reymond y col 1993). Aunque este anticuerpo no posee interés farmacéutico presenta aplicaciones potenciales en síntesis orgánica. Además, se optó por trabajar con el factor de transcripción LEC2 proveniente de *Arabidopsis thaliana*, que es uno de los integrantes de red conocida como AFL, la cual controla los procesos de formación del embrión, acumulación de reservas, tolerancia a la desecación y dormancia de las semillas. Se seleccionó una estrategia de expresión transitoria mediante agroinfiltración en *Nicotiana benthamiana*, debido a las consideraciones expuestas en la introducción.

En este sentido se planteó como objetivo general expresar inmunoglobulinas fusionadas a señales de direccionamiento vacuolar Ct-VSS y ss-VSS en hojas de *N. benthamiana*, analizar los rendimientos y vía de transporte seguida y evaluar el impacto de LEC2 en la síntesis de proteínas heterólogas.

Para alcanzar este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos.

Objetivo 1: estudiar la síntesis de un anticuerpo completo dirigido a vacuolas empleando dos señales de direccionamiento vacuolar diferentes: ctVSS (Ab-ctVSS) y ssVSS (Ab-ssVSS).

- Analizar la estabilidad de anticuerpos vacuolares (Ab-ctVSS y Ab-ssVSS).
- Evaluar la N-glicosilación de los anticuerpos vacuolares.
- Determinar el destino final de los anticuerpos fusionados a las señales de direccionamiento vacuolar
- Evaluar la ruta de transporte seguida por las distintas versiones del anticuerpo.

Objetivo 2: Evaluar el impacto de LEC2 en la síntesis de proteínas heterólogas.

- Clonar el gen LEC2 en un vector binario de expresión en plantas.
- Ajustar las condiciones de expresión transitoria de LEC2 en hojas de *N.benthamiana*.

- Analizar los efectos de LEC2 en la expresión de reporteros y funcionamiento de la vía secretoria.
- Evaluar el impacto de LEC2 en la síntesis de inmunoglobulinas dirigidas a distintos compartimientos.

**Capítulo I: Direccionamiento
vacuolar de anticuerpos
recombinantes en hojas de
*Nicotiana benthamiana***

Direccionamiento vacuolar de anticuerpos recombinantes en hojas de *Nicotiana benthamiana*

1. Introducción

La síntesis de proteínas de interés farmacéutico e industrial en plantas se ha vuelto una realidad con numerosos productos en el mercado y la existencia de numerosas tecnologías e instalaciones para producción a gran escala (Sack y col 2015, Lomonossoff y D'Aoust, 2016). Sistemas de producción estable y transitorio han sido utilizados con éxito para la producción de mAbs en diferentes especies de plantas, así como en diferentes tejidos y compartimentos subcelulares (De Muynck y col 2010, Donini y Marusic, 2019). Los niveles de acumulación de proteínas recombinantes dependen de múltiples factores, entre ellos, la localización subcelular (Egelkrout y col 2012). Las inmunoglobulinas son generalmente direccionadas al espacio apoplástico, espacio donde suelen sufrir de una intensa proteólisis (Benchabane y col 2008a, Niemer y col 2014). Es por ello que el direccionamiento a otras organelas se ha considerado como estrategias alternativas para mejorar su acumulación. En este sentido, la retención de Abs en el ER suele resultar en aumentos en los rendimientos (De Muynck y col 2010, Julve Parreno y col 2018). Si bien la vacuola central en plantas es considerada un ambiente hostil para la acumulación de proteínas heterólogas debido a su naturaleza híbrida, ha sido demostrado que algunas proteínas, como la glucocerebrosidasa (Shaaltiel y col 2007), alfa-manosidasa (De Marchis y col 2013), el factor del complemento humano C5a (Nausch y col 2012), colágeno (Stein y col 2009), la transglutaminasa 2 humana (Marin Viegas y col 2015) y la endolisina del bacteriófago CP933 (Kovalskaya y col 2015) cellobiohidrolasa II (Harrison y col 2014, Harrison y col 2011), pueden acumularse en esta organela. En contraste, en células de zanahoria en suspensión, las versiones secretorias de IgG1 e IgG4 humanas alcanzaron rendimientos mayores que las variantes de ER y vacuola (Shaaltiel y col 2012). La acumulación de anticuerpos completos en vacuolas de hojas no ha sido estudiada.

Como se detalló en la introducción general, **sección 4**, la vía secretoria en plantas es más compleja que en otros organismos eucariotas y en células vegetales coexisten

múltiples compartimentos vacuolares con funciones de reserva o degradación (Guang-Yuh Jauh y Rogers, 1998, Paris y col 1996, Frigerio y col 2008). Vacuolas de pequeño tamaño se fusionan para dar origen a vacuolas de mayor tamaño cuando diferentes procesos celulares tienen lugar (Zhang y col 2014). A su vez, proteínas con señales de direccionamiento vacuolar pueden ser transportadas a este compartimento siguiendo diferentes rutas. La vía de transporte convencional involucra la exportación desde el ER mediada por vesículas del complejo proteico COPII seguido por el transporte por el complejo de Golgi y post-Golgi (Xiang y col 2013). Adicionalmente, se ha descrito una vía de transporte desde el ER hacia la vacuola que es independiente de las vesículas COPII (De Marchis y col 2013, Viotti y col 2013). Las proteínas vacuolares poseen diferentes señales de direccionamiento vacuolares, las cuales pueden ser secuencia específicas, los motivos NPIXL o NPIR, o secuencias hidrofóbicas C-terminales (Matsuoka, 1999, Vitale, 1999). Estas VSSs son reconocidas específicamente por receptores de direccionamiento vacuolares que se localizan en el Golgi y post-Golgi, lo cual sugiere un mecanismo similar al de la vía de vesículas recubiertas de clatrina encontradas en otros organismos eucariotas (Niemes y col 2010b, Hinz y col 2007). Sin embargo, ha sido reportado que la interacción entre el cargo vacuolar con su VSR es iniciada en el ER (Niemes y col 2010a) y dicha interacción finaliza en el trans-Golgi y compartimentos prevacuolares (Kunzl y col 2016), lo cual apoyaría el modelo no convencional de transporte de proteínas vacuolares (Robinson y Pimpl, 2014, Xiang y col 2013).

Por lo expuesto en la **sección 3.2** de la introducción general proteínas N-glicosiladas, como las Igs, son moléculas adecuadas para estudiar los mecanismos de direccionamiento vacuolar debido a que el patrón de N-glicosilación que presentan permiten realizar inferencias sobre los procesos de tráfico intracelulares.

En el presente capítulo se estudiará el impacto del direccionamiento a vacuola en la acumulación de un IgG en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Con este objetivo, se fusionaron dos señales de direccionamiento a vacuola diferentes provenientes de la glubulina 11S de amaranto (KISIA, Ct y NIFRGF, ss) a la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 14D9. A su vez, otro de los propósitos del siguiente trabajo fue aportar

información para elucidar los mecanismos de transporte a vacuolas y el procesamiento de N-glicanos en este compartimento.

2. Resultados

2.1. Expresión transitoria de las variantes del mAb 14D9 en hojas de *Nicotiana benthamiana*

Con la finalidad de estudiar el impacto de la localización subcelular en la acumulación de una IgG completa, la cadena liviana (LC) portando la secuencia nativa del péptido señal (sec-LC) del anticuerpo monoclonal 14D9 fue combinada con diferentes versiones de la cadena pesada (HC), como es mostrado en la figura I.1. Las versiones secretorias (sec-HC) y de retículo (sec-HC) fueron utilizadas como referencias. La cadena pesada del anticuerpo 14D9 fue fusionada a secuencias de direccionamiento vacuolar bien caracterizadas, KISIA (vac1-HC) y NIFRGF (vac2-HC), provenientes de la proteína de reserva 11S de amaranto. Los ensayos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* fueron realizados por infiltración de *Agrobacterium tumefaciens* que portaban los genes de sec-LC y las diferentes variantes de HC: (i) sec-HC, para generar la versión secretoria (sec-Ab), (ii) ER-HC, para generar ER-Ab, (iii) vac1-HC y vac2-HC para producir vac1-Ab y vac2-Ab, respectivamente.

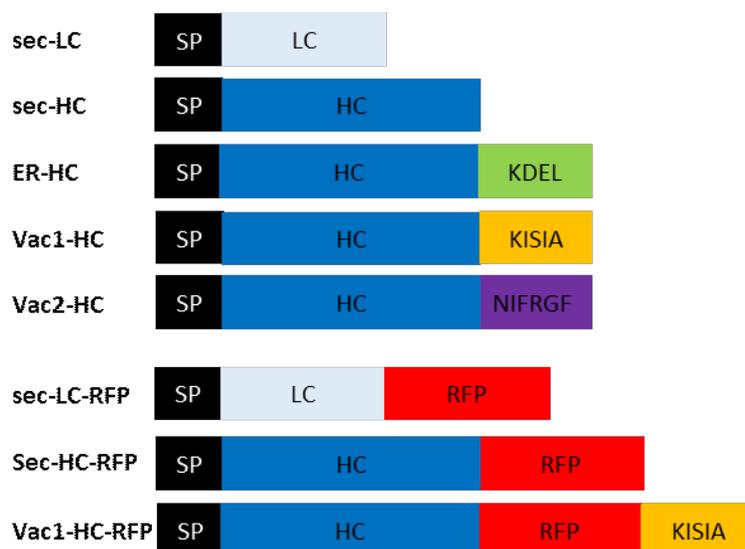


Figura I.1. Representación esquemática de las construcciones del mAb 14D9 utilizadas para ensayos de expresión transitoria mediada por *agrobacterium tumefaciens*.

Las proteínas fueron introducidas en la vía secretoria utilizando el péptido señal de una inmunoglobulina gamma-1 de ratón (Petruccioli y col., 2006). Las construcciones codificantes para la cadena pesada se encuentran en versiones: secretoria (sec-HC), de retículo endoplásmico (ER-HC), vacuolares (Vac1-HC y vac2-HC) y las fusionadas a RFP: secretoria (sec-HC-RFP) y vacuolar (HC-RFP-ctVSS). Las construcciones codificantes para la cadena liviana son las versiones: secretoria sec-LC y sec-LC-RFP. Las señales vacuolares son KISIA (CtVSS) y NIFRGF (ssVSS) (Petruccioli, y col 2007).

Los niveles de acumulación fueron analizados por ELISA tipo sándwich, utilizando hojas provenientes de cinco plantas diferentes para cada replicado biológico y al menos tres ensayos independientes. Los máximos niveles de expresión fueron obtenidos entre los días 5 – 8 post-infiltración. Los niveles de expresión obtenidos mediante ELISA para ER y vac-Abs fueron similares entre ellos (1.57% – 1.73% de la proteína total soluble, TSP) y fueron entre 10 – 15 veces mayores que los niveles observados para la versión secretoria ($0,13 \pm 0.02\%$ TSP). Posteriormente, se realizó un ensayo de ELISA indirecto con la finalidad de testear si LC y HC se ensamblaron en anticuerpos funcionales evaluando su capacidad de reconocer a su correspondiente antígeno. Las cuatro versiones de los anticuerpos fueron capaces de reconocer al hapteno (figura I.2b) y, a su vez, la señal obtenida mostró una buena correlación con los niveles de acumulación obtenidos por ELISA sándwich (figura I.2a).

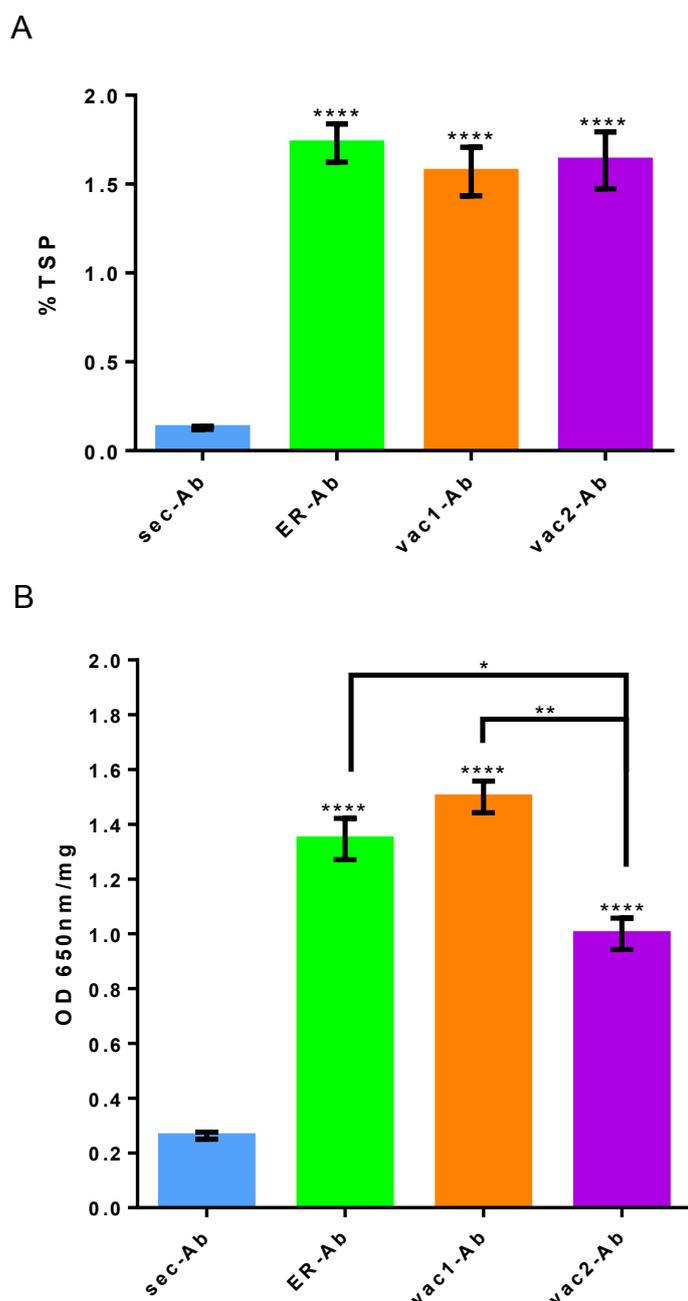


Figura I.2. Determinación de los niveles de expresión y unión a su antígeno de 14D9 por ELISA.

A) Niveles de acumulación de las diferentes versiones del Ab en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*. Los niveles de acumulación fueron cuantificados por ELISA sándwich en tres replicados biológicos y fueron expresados como % de la proteína total soluble (TSP). Las barras de error representan error estándar de la media (SEM). **** denota diferencia estadística utilizando el test de Tukey ($p \leq 0,0001$). Los niveles de ER-Ab, vac1-Ab y vac2-AB fueron 10-15 veces mayores que los de sec-Ab. Los niveles de las versiones de ER y vacuolares no difirieron significativamente entre ellos.

B) Reconocimiento de BSA-14D9 hapteno. Se realizó un ensayo de ELISA indirecto utilizando la misma cantidad de proteína total soluble de hoja por well. Los valores fueron expresados como DO a 650 nm por mg de proteína. Los datos presentan la media \pm SEM de tres ensayos independientes. Las cuatro versiones del Ab reconocieron al hapteno, indicando que la inmunoglobulina se plegó correctamente. Diferencia estadísticamente significativa por test de Tukey: **** $p \leq 0,0001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$.

Los anticuerpos fueron purificados de hojas utilizando cromatografía de afinidad con proteína G y analizados por inmunoblot usando suero anti-mouse Ig para su detección. En condiciones reductoras, dos bandas de 25 kDa y 52 kDa fueron detectadas (Figura I.3a), correspondientes a LC y HC respectivamente. Mientras que, en condiciones no reductoras, las cuatro versiones del Ab dieron una única banda de peso molecular 170 kDa (Figura I.3b), confirmando que las cuatro variantes de HC utilizadas pueden ensamblarse con LC para formar heterotetrámeros y que los anticuerpos ensamblados pueden purificarse de las hojas.

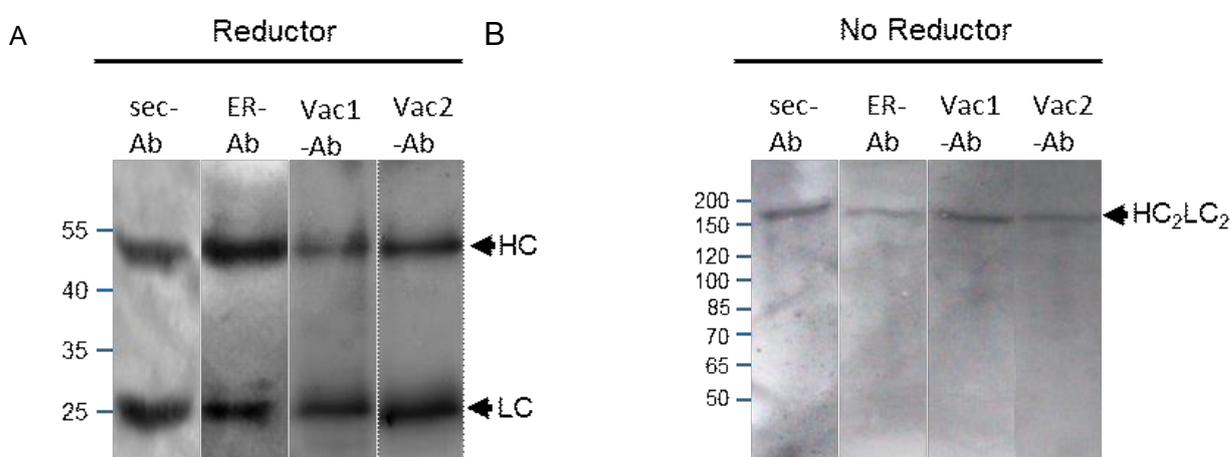


Figura I.3 Inmunodetección de los anticuerpos purificados.

Se realizó un SDS-PAGE en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B) y la detección se realizó utilizando suero de cabra anti-IgG de ratón biotilado. Las flechas negras indican a la IgG ensamblada (170kDa), HC (52kDa) y LC (25kDa). Los pesos moleculares están expresados en kilo-Dalton.

2.2. Patrón de glicosilación del mAb14D9

El patrón de glicosilación de los anticuerpos purificados fue determinado por MALDI-TOF-MS como es descrito por Stadlmann y col (2008). El espectro de masa del glicopéptido EEQFNSTFR (1157,52 Da), el cual porta el único sitio de glicosilación del anticuerpo 14D9 (Asn297, localizado en el dominio de la fracción constante) de las diferentes variantes de los anticuerpos purificados es mostrado en la figura I.4. Sec-Ab exhibe principalmente N-glicanos complejos compuestos por estructuras GnGnXF, GnF y GnGn (73%), típicas de oligosacáridos procesados en el Golgi (Tabla I.1). Notablemente, 27% de las estructuras presentes corresponden a corresponden a glicanos oligomanosídicos (Man 7-9). En contraste, vac1 y vac2-Ab presentaron

mayoritariamente estructuras oligomanosídicas (75%), típicas de moléculas retenidas en el ER. A su vez, se observa un 25% de estructuras nGnXF. No se detectaron estructuras paucimanosídicas en las variantes vacuolares (Tabla I.1).

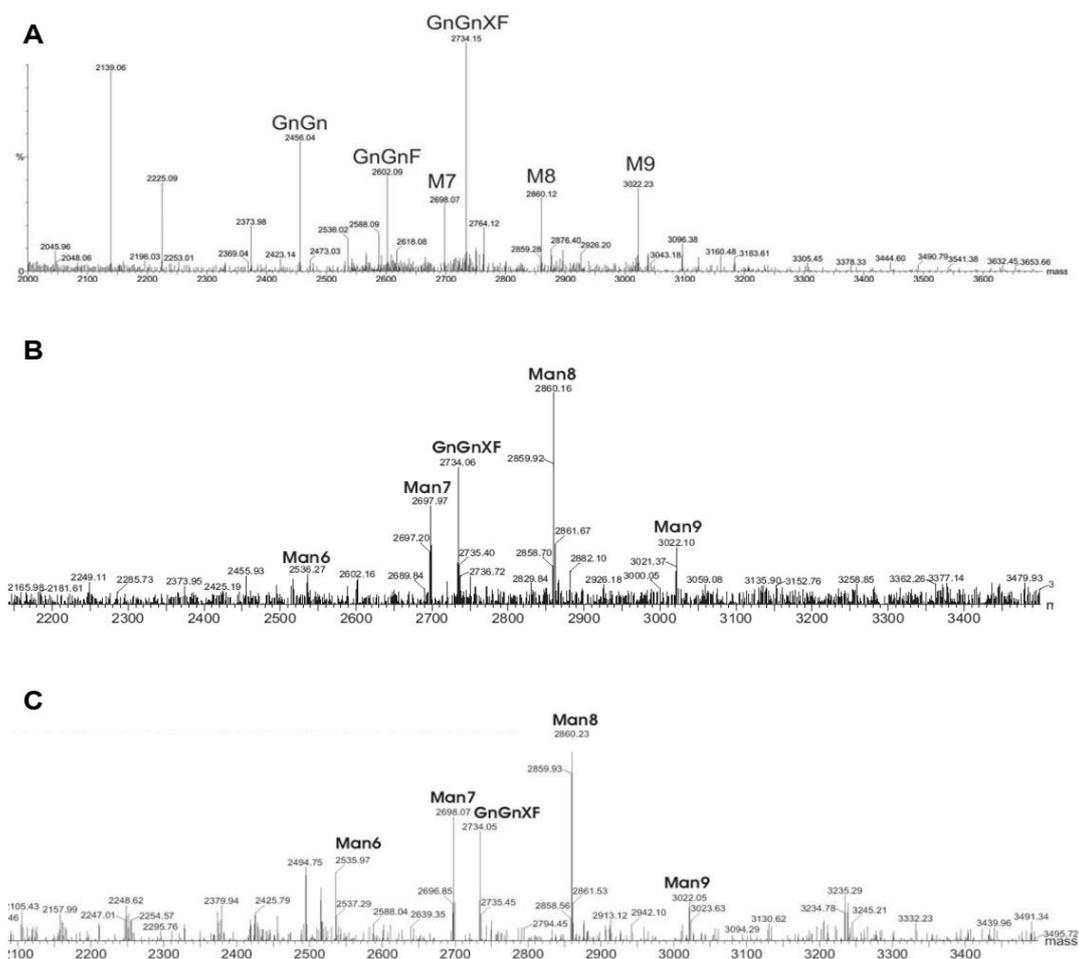


Figura I.4. Espectro de masa del glicopéptido EEQFNSTFR (1157,52 Da)

El glicopéptido EEQFNSTFR porta el único sitio de glicosilación del anticuerpo 14D9 (Asn297 localizado en el dominio de la fracción constante) perteneciente a: sec-Ab (A), vac1-Ab (B) y vac2-Ab (C).

Tabla I.1 Perfil de N-glicanos de las diferentes variantes del Ab 14D9

Especie de N-glicano	Sec-Ab (%)	Vac-Ab (%)
Complejos (totales)	73	25
GNGNXF	43	25
GnF	14	-
GnGn	16	-
Oligomanosidicos (Man 7-9)	27	75

2.3. Localización subcelular de las diferentes versiones del anticuerpo 14D9

Diferentes versiones del anticuerpo fusionadas a RFP fueron generadas (Figura I.1) y la deposición de proteínas fue monitoreada por microscopia confocal de escaneo laser (CLSM). Conjuntamente se analizó la expresión de las diferentes versiones de HC y LC fusionadas a RFP generadas con la finalidad de confirmar que la fusión a RFP no afectaba la localización subcelular de los diferentes Ab. La Figura I.5A muestra que sec-LC-RFP presenta un patrón irregular en el borde de la célula de la hoja, el cual es típico de localización apoplástica (la fluorescencia roja se muestra en magenta en la figura) y no se observa colocalización con ER-GFP. En contraste, sec-HC-RFP exhibe un patrón típico de retículo endoplásmico y colocaliza con ER-GFP (Figura I.5B, el color blanco proviene de la fusión de los canales verde de GFP y magenta de RFP). Este resultado concuerda con el modelo propuesto para el ensamblado *in vivo* de Ig, el cual indica que el dominio CH1 de HC no puede plegarse en ausencia de LC y, por lo tanto, se mantiene retenida en el ER (Feige y col 2009). Al expresar sec-LC-RFP y sec-HC-RFP, se observa un patrón apoplástico (Figura I.5C), lo cual indicaría que la fusión a RFP no afecta la localización final de sec-Ab-RFP. De manera similar, al expresar sec-LC y sec-HC-RFP (figura I.5d) o sec-LC-RFP y sec-HC (Figura I.5E) se obtiene el mismo patrón de apoplasto. Cuando se coexpresan sec-LC-RFP con ER-HC (Figura I.5F) un patrón típico de ER es obtenido. En cambio, al expresar a sec-LC-RFP con vac1-HC (Figura I.5G), vac2-HC (Figura I.5H) y vac1-HC-RFP (Figura I.5I) se observó una intensa fluorescencia roja en el lumen de la vacuola central, sin presencia de colocalización con ER-GFP, ni siquiera alrededor de la envoltura nuclear. Con la finalidad de estudiar la eficiencia del direccionamiento vacuolar, un análisis cuantitativo fue realizado. Fluorescencia roja fue detectada en $76,6\% \pm 8,3$ y $79,4\% \pm 11,5$ de las células de la epidermis que expresaban vac1-Ab-RFP y

vac2-Ab-RFP, respectivamente (Figura I.6), lo cual confirma que ambas proteínas fueron eficientemente direccionadas a la vacuola. Adicionalmente, la presencia de fluorescencia roja en hojas infiltradas con agrobacterias que portaban las construcciones de sec-Ab y ER-Ab fueron también analizadas y en ambos casos fue inferior al 5%. Teniendo en cuenta estos resultados, puede anticiparse que las estructuras oligosacáridas observadas en los vac-Abs no se debieron a retención parcial en el ER, sino que provienen de anticuerpos presentes en la vacuola.

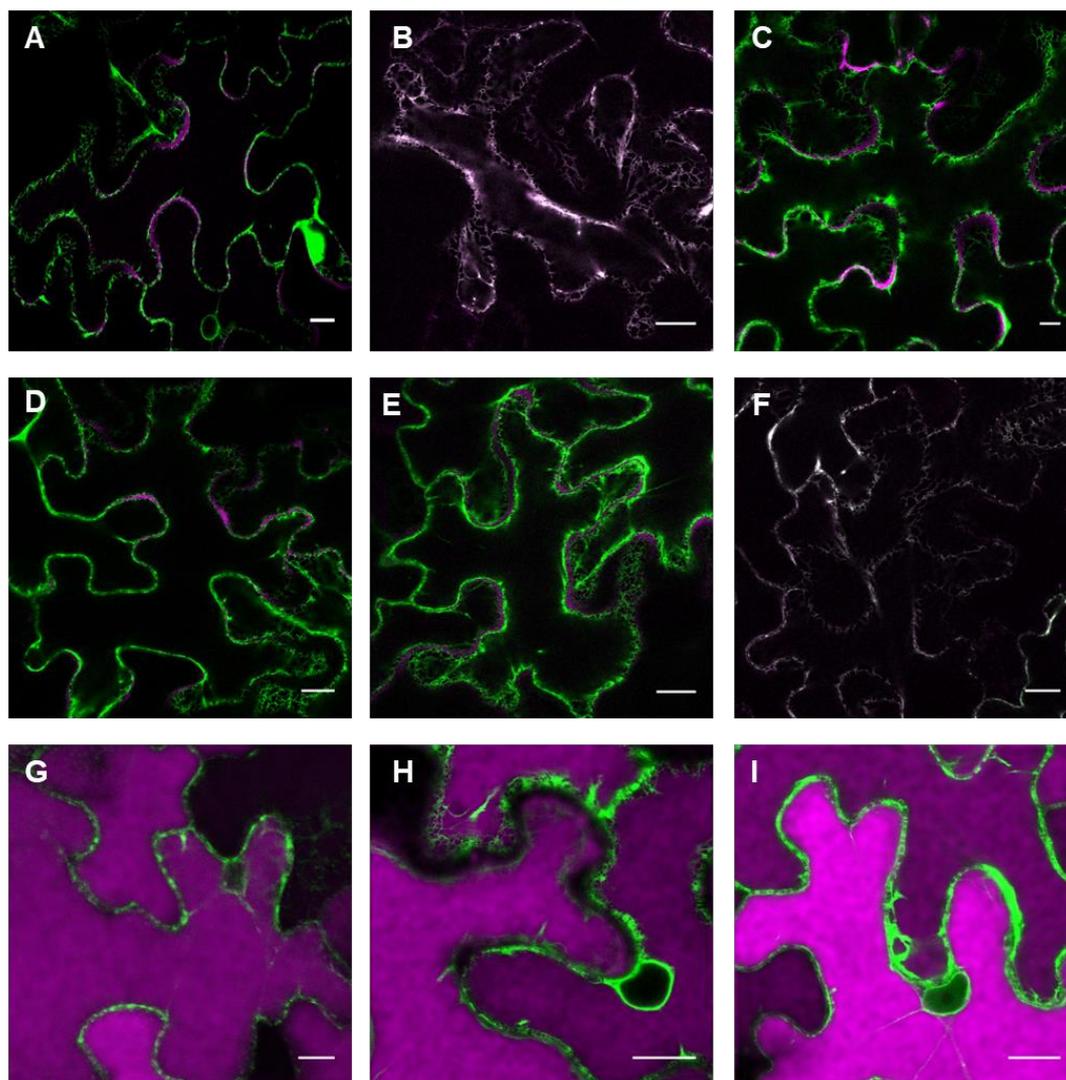


Figura I.5 Localización subcelular de las diferentes versiones del Ab por CLSM.

Hojas de *N. benthamiana* fueron infiltradas con ER-GFP y diferentes combinaciones de HC- y LC-RFP como se indica a continuación sec-LC-RFP (A), sec-HC-RFP (B), sec-LCRFP + sec-HC-RFP (C), sec-LC + sec-HC-RFP (D), sec-LC-RFP + sec-HC (E), sec-LC-RFP + ER-HC (F), sec-LC-RFP + vac1-HC (G), sec-LC-RFP + vac2-HC (H), sec-LC + vac1-HC-RFP (I). Las imágenes corresponden a la superposición de los canales rojo (mostrado en magenta) y verde. La colocalización es mostrada en blanco. (A) sec-RFP presenta un patrón irregular rojo típico de localización en el apoplasto. (B) sec-HC-RFP presenta un patrón típico del retículo endoplásmico. (C) sec-LC-RFP + sec-HC-RFP presentaron un patrón de localización en el apoplasto. (D, E) sec-LC + sec-HC-RFP y sec-LC-RFP + sec-HC se localizaron en el apoplasto. (F) sec-LC-RFP + ER-HC presentaron un patrón de ER. (G-I) sec-LC-RFP + vac1-HC, sec-LC-RFP + vac2-HC y sec-LC + vac1-HC-RFP mostraron una intensa fluorescencia roja en el lumen de la vacuola central. Escala de la barra 15 μ m.

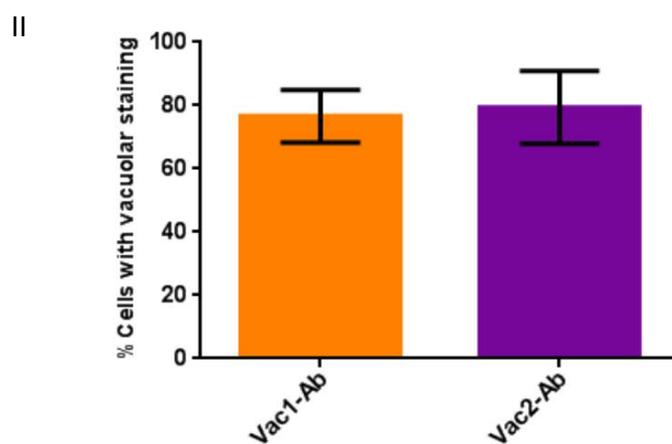
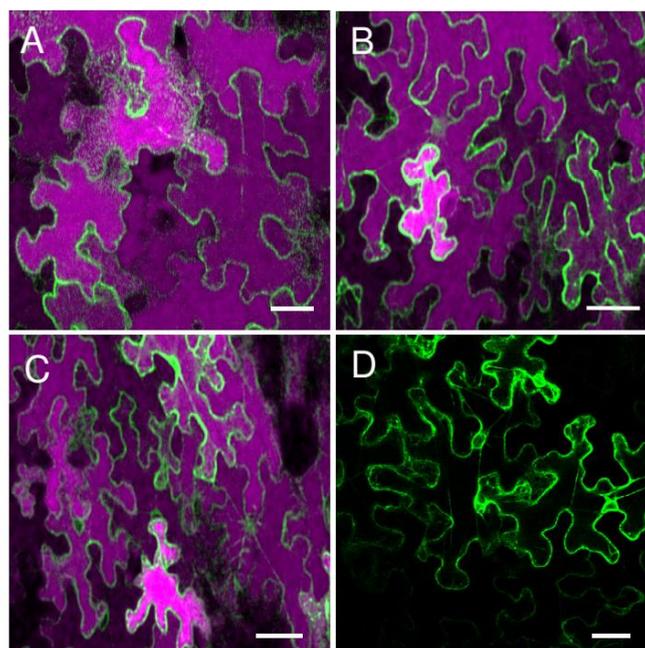


Figura I.6. Eficiencia del direccionamiento vacuolar.

Parte I: Micrografías de células de epidermis de hojas de *N. benthamiana* (A) sec-LC-RFP + vac1-HC; (B) sec-LC + vac1-HC-RFP; (C) sec-LC-RFP + vac2-HC; (D) vector pGWB2 vacío. Escala de la barra 50 μ m. Part II: análisis cuantitativo de la eficiencia del direccionamiento vacuolar. Se contó el número de células con marca roja en la vacuola central sobre el número total de células en diez imágenes obtenidas con baja magnificación de hojas expresando sec-LC-RFP + vac1-HC o sec-LC-RFP + vac2-HC.

Para verificar que la fluorescencia roja observada proviene de las fusiones HC-RFP y LC-RFP intactas, se realizó un inmunoblot en condiciones reductoras utilizando anticuerpo específico contra RFP (Figura I.7). Sólo bandas de 50 kDa y 77 kDa, correspondientes a LC-RFP y HC-RFP, respectivamente, fueron detectadas para las diferentes combinaciones de LC y HC (Figura I.7), lo cual confirma la integridad de las fusiones a RFP.

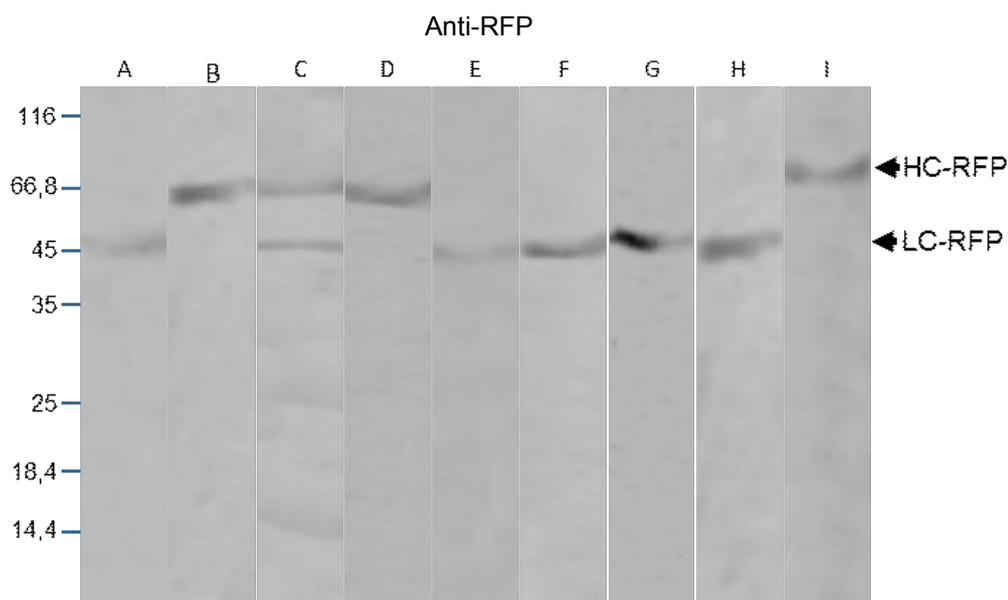


Figura I.7. Análisis de la integridad de las fusiones a RFP por inmunoblot.

Extractos totales de hojas de *N. benthamiana* infiltradas como se describió en la figura 5 fueron separados por SDS-PAGE en condiciones reductoras y la integridad de las fusiones fue monitoreada utilizando anticuerpos contra RFP. Calle A: sec-LC-RFP; Calle B: sec-HC-RFP; Calle C: sec-LC-RFP + sec-HC-RFP; Calle D: sec-LC + sec-HC-RFP; Calle E: sec-LC-RFP + sec-HC; Calle F: sec-LC-RFP + ER-HC; Calle G: sec-LC-RFP + vac1-HC; Calle H: sec-LC-RFP + vac2-HC; Calle I: sec-LC + vac1-HC-RFP: Los pesos moleculares están expresados en kilo-Dalton.

Debido a que la intensa fluorescencia roja presente en el lumen de la vacuola central podría enmascarar el patrón de ER, se aislaron microsomas de hojas infiltradas con las cuatro variantes del anticuerpo y las fracciones obtenidas fueron analizadas por inmunoblot. La figura I.8 muestra que tanto vac1-Ab y vac2-Ab, así como sec-Ab fueron detectados únicamente en la fracción soluble (FS). Por otro lado, ER-Ab fue detectado tanto en la FS como en el pellet microsomal (PM). Este resultado concuerda con el obtenido para otras proteínas residentes del ER como BiP (Abas y Luschnig, 2010, Yamamoto y col 2008). Estos resultados confirman que únicamente ER-Ab se

encontraba localizado en el ER, mientras las otras variantes del Ab estuvieron ausentes en la fracción microsomal, por lo tanto, las estructuras de glicanos observadas en los vac-Abs no se debieron a retención en el ER.

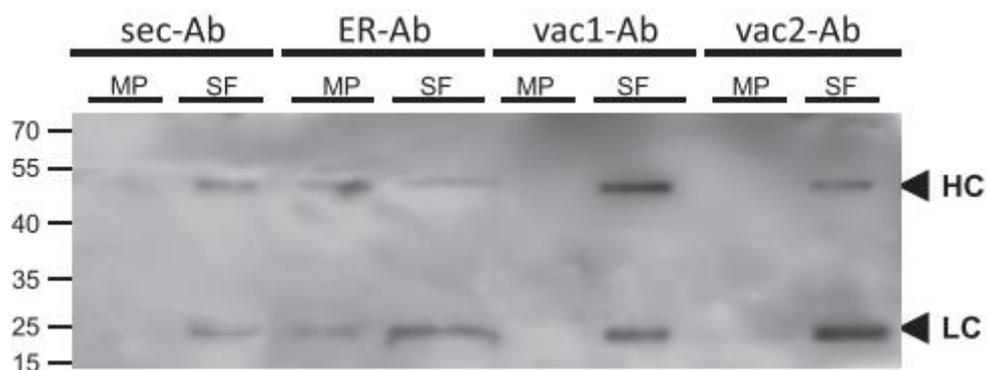


Figura I.8. Inmunodetección de las fracciones onbetidas al aislar microsomas.

Hojas de *N. benthamiana* fueron infiltradas con agrobacterium que portaban sec-LC + sec-HC (sec-Ab), sec-LC+ ER-HC (ER-Ab), sec-LC+ vac1-HC (vac1-Ab) or sec-LC + vac2-HC (vac2-Ab) molidas en buffer de extracción que contenía sacarosa. La fracción soluble (SF) y el pellet microsomal (MP) fueron aislados mediante centrifugación difetencial. SF y MP fueron separados por SDS-PAGE en condiciones reductoras y la inmunodetección se realizó utilizando un Suero contra IgG de ratón. Sec-Ab, vac1-Ab and vac2-Ab fueron detectados únicamente en la SF mientras que ER-Ab fue detectada en ambas fracciones. Las flechas negras indican HC (52 kDa) y LC (25 kDa). Los pesos moleculares se indican en kilo-Dalton.

3. Discusión

Actualmente, diferentes especies de plantas pueden ser modificadas para producir anticuerpos monoclonales, como *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, lechuga, maíz y tomate, sin embargo, las plataformas más avanzadas para producir inmunoglobulinas G en plantas son los sistemas de expresión, tanto estables como transitorios, en hojas de tabaco, donde es posible alcanzar rendimientos de varios miligramos por kilogramo de hoja (Donini y Marusic, 2019, Yusibov y col 2016, Mapp Biopharmaceuticals, 2015, Ma y col 2015). En este tejido, los anticuerpos son generalmente direccionados al apoplasto, un entorno que favorece la degradación proteica (Benchabane y col 2008a, Niemer y col 2014). Diferentes estrategias han sido probadas para prevenir la degradación de proteínas en este espacio (Goulet y col 2012, Jutras y col 2015a, Robert y col 2013a), sin embargo, aún no se han logrado soluciones satisfactorias. En este sentido, el direccionamiento de las inmunoglobulinas a diferentes espacios intracelulares es una estrategia ampliamente utilizada. En este capítulo se realizó un análisis del impacto de direccionar anticuerpos completos a vacuolas en hojas de *N. benthamiana*. Demostrando que las variantes vacuolares ensayadas del mAb14D9 se acumularon en niveles 10 – 15 veces mayores que la versión secretoria. Si bien ha sido reportado que la retención de anticuerpos en el ER resulta en algunos casos en aumentos en los niveles de acumulación (Song y col 2018, Juarez y col 2013, Ko y col 2005, Petruccelli y col 2006a), la acumulación de Ig direccionadas a vacuola en hojas no había sido reportada previamente. Sólo un reporte comparaba los niveles de acumulación en apoplasto y vacuolas de mAbs expresados en células de zanahoria en suspensión, y en este caso los mayores niveles de acumulación para las IgG1 y 4 humanas fueron obtenidos para las variantes secretadas (Shaaltiel y col 2012). A pesar de que se ha reportado la presencia de enzimas proteolíticas en la vacuola central (Jaquinod y col 2007), la degradación proteica depende de varios factores como condiciones ambientales (por ejemplo pH) que influyen la actividad proteolítica. Por ejemplo, la variante vacuolar de GFP es propensa a sufrir proteólisis como resultado de la acidificación dependiente de la luz de la vacuola, sin embargo, es estable en condiciones de oscuridad (Tamura y col 2003). Aquí, mostramos que una IgG de ratón se acumula en altos niveles en la vacuola central, demostrando baja actividad

proteolítica relacionada a anticuerpos. Resultados similares fueron reportados para la α -manosidasa humana (De Marchis y col 2013), factor del complemento humano C5a (Nausch y col 2012), colágeno (Stein y col 2009), inhibidor de proteasas α 1 humano (Jha y col 2012) y transglutaminasa2 humana (Marin Viegas y col 2015).

A su vez, se demostró la robustez de la fusión a RFP para visualizar la localización subcelular de los Abs. Estas fusiones tienen que ser realizadas con mucho cuidado debido a que podrían intervenir con las propiedades del anticuerpo. En células de animales, la fusión de IgG a citrina (proteína fluorescente amarilla) pero no a GFP resulta en la producción de la inmunoglobulina correctamente plegada, secretada y funcional (Haas y col 2010). En plantas, poco es sabido acerca del impacto de la fusión de proteínas fluorescentes. La fusión a RFP monomérica y la proteína fluorescente amarilla venus al anticuerpo monoclonal 2G12 resultó en moléculas que no fueron secretadas, siendo retenidas en compartimentos pre-vacuolares (Irons y col 2008). A diferencia de estos ejemplos citados, en el presente trabajo se mostró que las fusiones del anticuerpo 14D9 a RFP fueron eficientemente direccionadas a su localización subcelular final.

La presencia predominante de N-glicanos complejos (GnGnXF, GnGn y GnGnF) en sec-Ab indica su transporte a través del aparato de Golgi. Los estudios de CLSM realizados demostraron que las diferentes versiones del anticuerpo secretorio utilizadas son correctamente secretadas. No se observó colocalización con ER-GFP, indicando que sólo trazas del anticuerpo se encontraban retenidas o en tránsito en el ER. Adicionalmente, análisis de inmunoblot de las fracciones microsomales indicaron que sec-Ab no se localiza en el ER. Por lo tanto, la fracción oligomanosídica detectada (aproximadamente 27%) podría deberse a una exposición limitada del sitio de glicosilación de la Fc lo cual impidió la acción de las enzimas implicadas en el procesamiento posterior de los glicanos. Resultados similares fueron obtenidos para otros anticuerpos secretorios producidos en plantas (Loos y col 2011b, Loos y col 2011d, Westerhof y col 2014). Curiosamente, los vac-Abs presentaron predominantemente estructuras oligomanosídicas (75%) y una porción significativa (25%) de glicanos complejos. Debido a que estos anticuerpos fueron detectados únicamente el lumen de la vacuola central por CLSM y el inmunoblot de las fracciones microsomales no mostró señales de retención en el ER, esto indicaría que estas variantes del anticuerpo son transportadas a la vacuola central siguiendo dos vías diferentes: una directa desde el ER

hacia la vacuola (anticuerpos que presentan estructuras manosídicas) y una mediada por el Golgi seguida por aquellas moléculas que presentan estructuras de glicanos complejas. Estos datos indican que, a pesar que el direccionamiento vacuolar incrementa los niveles de acumulación, únicamente 25% de las moléculas presentan glicanos completamente procesados, una formación generalmente necesaria para aplicaciones terapéuticas.

Los análisis de inmunoblot y de capacidad de unión a su antígeno, demostraron que los vac-Abs se ensamblaron correctamente y eran funcionales. Es sabido que proteínas no plegadas o plegadas incorrectamente en el ER activan la respuesta de degradación asociada al ER (ERAD), liberando proteínas del ER para su degradación en el proteosoma. A su vez, una ruta mediada por autofagia que transporta proteínas mal plegadas a la vacuola para su degradación ha sido descrita (Yang y col 2016). Teniendo en cuenta que HC y LC se ensamblan en inmunoglobulinas funciones en el ER (Feige y col 2009), se puede anticipar que los vac-Abs fueron transportados a la vacuola como proteínas completamente ensambladas. A su vez, como sec-Ab fue encontrado en el apoplasto, es poco probable que los vac-Abs hayan sido transportados a la vacuola por VSSs ocultos en la secuencia de la proteína, como ha sido reportado para una HC híbrida IgA/G (Hadlington y col 2003).

Las Ct-VSS son típicas de proteínas de reserva de semillas que son empaquetadas en vesículas densas que se desprenden del cis-Golgi, mientras que las ss-VSS son características de enzimas líticas encontradas en compartimentos del post-Golgi (Vitale y Hinz, 2005). Estudios previos utilizando proteínas fluorescentes no glicosiladas fusionadas a VSS derivados de proteínas de reserva de semilla o proteínas líticas mostraron que estos reporteros se acumulaban en los mismos compartimentos prevacuolares y que interactuaron con los receptores de direccionamiento vacuolar de manera similar, indicando que los dos tipos de VSS seguirían la misma ruta de transporte hacia la vacuola (Kunzl y col 2016, Niemes y col 2010a, Miao y col 2008). Aquí, usando anticuerpos como reporteros, lo cual nos permitió seguir la ruta de tránsito seguida a través del grado de glicosilación, mostramos que las señales de direccionamiento C-terminal y secuencia específica direccionan la proteína cargo siguiendo la misma vía, a pesar que originalmente diferentes mecanismos de transporte fueron inferidos (Vitale y Hinz, 2005).

Una ruta de direccionamiento directa fue descrita en semillas de zapallo donde vesículas PAC transportan proteínas de reserva desde el ER hacia la vacuola sin pasar por el Golgi (Mitsubishi, 2001), sin embargo, en hojas poca información apoya un transporte directo de proteínas cargo. El reconocimiento de los VSS por receptores de reconocimiento en el ER (Niemes y col 2010a), su subsecuente separación en el trans-Golgi (Kunzl y col 2016) y el transporte de la α -manosidasa humana en hojas de tabaco (De Marchis y col 2013) son otras pruebas del “modelo no clásico” que ha sido recientemente propuesto (Robinson y Pimpl, 2014). En el presente trabajo mostramos que el 75% de las moléculas cargo siguen una ruta de transporte directa hacia la vacuola. El motivo por el cual la misma inmunoglobulina alcanza la vacuola siguiendo dos vías de transporte diferentes es todavía desconocido, sin embargo, saturación de la vía de transporte como ocurre al sobreexpresar Inmunoglobulinas G en células CHO (Hasegawa y col 2011) puede activar la vía de transporte directo a vacuolas en plantas.

El patrón de N-glicosilación de un reducido número de glicoproteínas vacuolares, la mayoría de ellas de semillas, ha sido determinado, y basados es estos estudios, fue postulado que en la vacuola los residuos terminales GlcNAC de los oligosacáridos GnGn son removidos para producir estructuras pausimanosídicas (Gomord y col 2010). Adicionalmente, en células de zanahoria, la enzima glucocerebrosidasa fusionada a la Ct-VSS de la quitinasa A de tabaco poseía mayoritariamente estructuras pausimanosídicas (Shaaltiel y col 2007), lo cual apoya la eliminación de los residuos GlcNAc terminales en vacuolas. Además, una IgG de ratón fusionada a la señal NPIRL de la esporamina expresada en células BY2 presentaron principalmente oligosacáridos del tipo MMXF (Misaki y col 2011). A diferencia de estos resultados, los diferentes vac-Abs estudiados no presentaron estructuras paucimanosídicas. De manera similar a estos resultados, la IgA humana secretoria expresada en *Nicotiana benthamiana* se acumuló en compartimentos intracelulares (cuerpos proteicos y vacuolas), pero no en el apoplasto y presento predominantemente estructuras ricas en manosa y la presencia de estructuras pausimanosídicas fue limitada (Paul y col 2014). Por otro lado, una porción significativa de estructuras paucimanosídicas fue detectada en el fluido apoplastico al analizar el secretoma de células de plantas (Schneider y col 2015) y en proteínas recombinantes localizadas en el apoplasto (Castilho y col 2014, Dirnberger y col 2001).

Considerando toda esta información se debería reevaluar la consideración de que las estructuras pausimanosidicas son típicas/específicas de vacuolas.

En conclusión, se demostró que la deposición de anticuerpos en el interior celular, ya sea el ER o la vacuola produce aumentos en los rendimientos de producción al compararlo con la acumulación en el apoplasto. Es importante remarcar, que los anticuerpos producidos en los diferentes compartimentos fueron funcionalmente activos. Si bien el patrón de N-glicosilación de los anticuerpos obtenidos intracelularmente podrían no ser útiles para aplicaciones industriales donde es preferible la presencia de estructuras complejas, estos podrían ser útiles para aplicaciones biomédicas y de investigación. Otra posible aplicación podría ser la síntesis de anticuerpos aglicosilados terapéuticos con funciones efectoras novedosas (Hristodorov y col 2013).

**Capítulo II: Impacto de la
sobreexpresión del gen LEC2
(*Leafy cotyledon 2*) en hojas de
*Nicotiana benthamiana***

Efecto de LEC2 sobre la producción de proteínas heterólogas

1. Introducción

LEC2 es un regulador clave del desarrollo de la semilla que posee un dominio de unión al DNA de tipo B3, específico de plantas. Esta región de unión al DNA tiene roles críticos durante el desarrollo y maduración de la semilla en *Arabidopsis thaliana*. A su vez, LEC2 regula otros reguladores maestros, entre ellos LEC1 y otros factores de transcripción con dominio B3, FUS3 y ABI3. Estos factores de transcripción forman una red encargada de mantener la morfología del suspensor, la especificación de la identidad de cotiledón, la progresión por la fase de maduración y la supresión de la germinación prematura. LEC2 es un regulador positivo de LEC1, FUS3 y ABI3, y, subsecuentemente, ABI3 y FUS3 se regulan positivamente durante la maduración de la semilla (Devic y Roscoe, 2016, Carbonero y col 2017).

Se ha determinado que LEC2 es responsable de regular la composición química de la semilla durante su proceso de llenado y semillas maduras de mutante de pérdida de función *lec2* en *A. thaliana* poseen 15% menos proteínas y 30% menos lípidos (Angeles-Nunez y Tiessen, 2011). LEC2 controla la transcripción de los genes hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD1) y las isoformas de OLEOSINA identificadas en cuerpos lipídicos presentes en semillas maduras de *A. thaliana*. Además, un target directo de LEC2 es WRI1 el cual está involucrado en la acumulación de triacilgliceridos (TAGs) y en el metabolismo de ácidos grasos en semillas maduras de *Arabidopsis* (Baud y col 2009).

Además de regular la cantidad y composición de ácidos grasos en semillas, la expresión ectópica de LEC2 induce la formación de embriones somáticos en tejidos vegetativos al inducir la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de auxinas (Wojcikowska y col 2013). A su vez, ha mostrado que es capaz de modificar las características de la vacuola central de la hoja generando vacuolas más pequeñas del tipo de las PSV encontradas en semilla (Feeney y col 2013a, Feeney y col 2013b).

Las potenciales aplicaciones biotecnológicas de LEC2 han sido estudiadas por estrategias de ingeniería metabólica con el objetivo de expresar en tejidos vegetativos

rutas biosintética que son usualmente únicas de semillas. Este enfoque ha sido utilizado con la finalidad de aumentar los niveles de ácidos grasos en hojas para genera biocombustibles (Smigocki y Bruccoleri, 2017, Andrianov y col 2010). Sin embargo, este enfoque no ha sido aplicado en la producción de proteínas de interés en plantas.

En este capítulo se estudiará los efectos de expresar transitoriamente el gen LEC2 de *A. thaliana* en hojas de *N. benthamiana* en la acumulación de proteínas foráneas.

2. Resultados

2.1. Expresión transitoria del gen LEC2 de *Arabidopsis thaliana* en hojas de *Nicotiana benthamiana*

El gen LEC2 proveniente de *A. thaliana* fue adquirido por medio del *Arabidopsis Stock Center* en el vector de entrada pENTR221. El subclonado fue realizado en los vectores binarios pEAQ-HT-DEST1 y pMDC43, este último permite generar la fusión N-terminal a GFP, utilizando la tecnología Gateway™. Dado que el vector de entrada pNTR221 y los vectores de expresión utilizados poseían el gen de resistencia a la kanamicina se digirió a pNTR221-LEC2 con las enzimas NheI y EcoRV, 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 clonasa LR del sistema Gateway y pEAQ-HT-DEST1 o pMDC43 como vector de destino (Figura II.1). De esta forma se obtuvieron las construcciones LEC2 y la versión reportera GFP-LEC2 (Figura II.1).

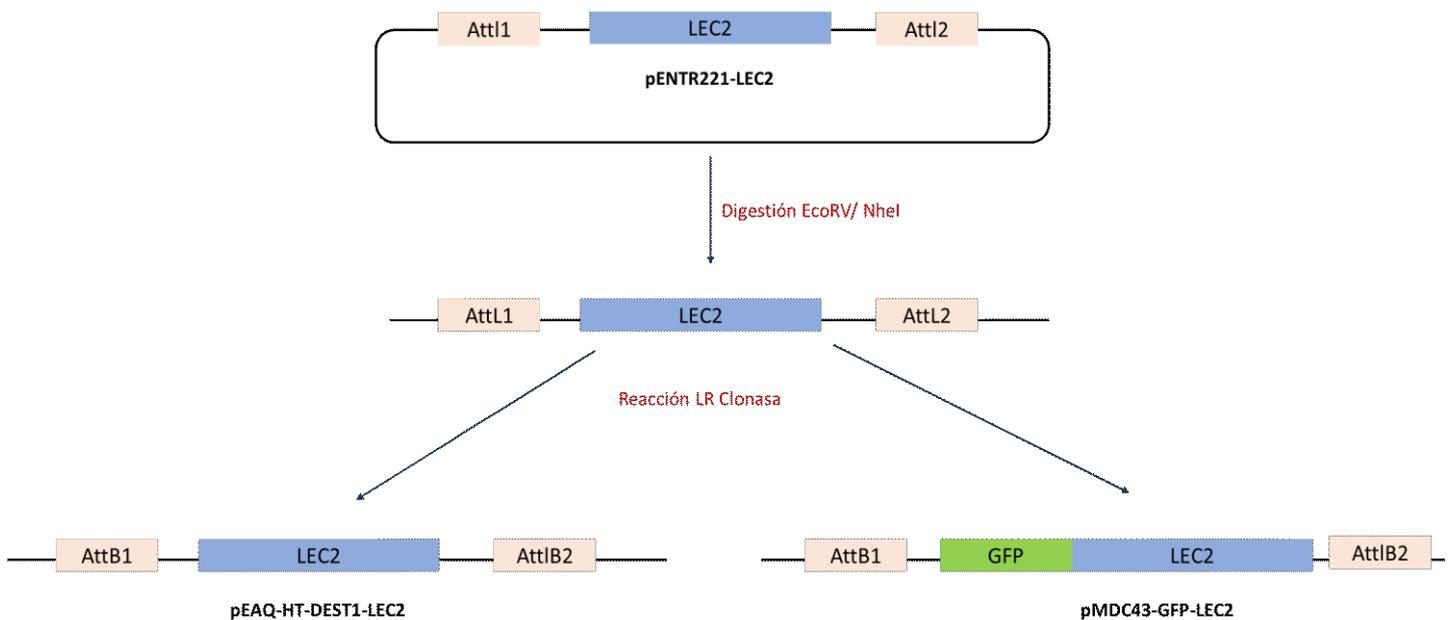


Figura II.1. Estrategia de clonado utilizada para obtener pEAQ-HT-DEST1-LEC2 y pMDC43-GFP-LEC2. El vector pENTR221-LEC2 fue digerido con EcoRV y NheI para eliminar el origen de replicación y la resistencia a kanamicina. La siguiente reacción fue una recombinación con el sistema Gateway® entre los sitios attL1 y attL2 del pENTR221 con los sitios attR1 y attR2 de pEAQ-HT-DEST1 y pMDC43 dando como resultado los vectores binarios pEAQ-HT-DEST1 y pMDC43-GFP-LEC2, respectivamente. El esquema no está dibujado a escala.

Debido a que el gen LEC2 proviene de un organismo diferente, su integridad y correcta expresión y localización fue verificada en hojas de *N. benthamiana* utilizando la versión reportera fusionada a GFP. La localización subcelular fue monitoreada por CLSM entre los días 2 – 9 dpi. La figura II.2A muestra que, a pesar de provenir de *A. thaliana*, LEC2 se localizó correctamente en el núcleo, motivo por el cual sería capaz de realizar sus funciones efectoras. Para verificar que la fluorescencia verde observada provenía de la fusión intacta, se realizó un inmunoblot en condiciones reductoras utilizando un anticuerpo específico contra GFP (Figura II.2B). Sólo una banda de aproximadamente 77 kDa fue detectada en los extractos provenientes de hojas infiltradas con GFP-LEC2, tamaño que corresponde a la fusión intacta.

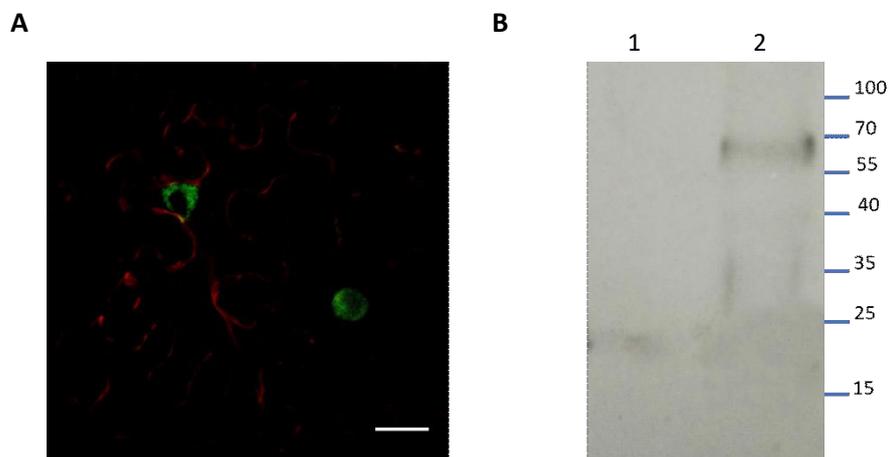


Figura II.2. Análisis de localización subcelular de GFP-LEC2 e integridad de la fusión.

A) Hojas de *N. benthamiana* fueron infiltradas con ER-RFP y GFP-LEC2. La imagen muestra la superposición de los canales rojo y verde. GFP-LEC2 se localizó en el núcleo. Escala de la barra 25 μm . B) Extractos totales de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con GFP-LEC2 (1) y ER-RFP o plantas WT (2) fueron separados por SDS-PAGE en condiciones reductoras y la integridad de la fusión fue monitoreada utilizando anticuerpos contra GFP. Los pesos moleculares están expresados en kilo-Dalton.

Teniendo en cuenta lo compleja y delicada que es la interacción entre factores de transcripción y sus DNA targets, y la capacidad de LEC2 de formar heterodímeros con otros factores de transcripción, para estudiar los efectos de la expresión en *N. benthamiana* se utilizó la versión de LEC2 nativa, sin ningún polipéptido adicional con la finalidad de evitar posibles interacciones aberrantes.

2.2. Diseño experimental

LEC2 se expresó dirigido por el promotor CaMV35S en hojas de *N. benthamiana* y se analizó el impacto en la expresión de genes reporteros también dirigidos por el CaMV35S. Debido a que el vector pEAQ-HT-DEST1 posee la secuencia codificante para el supresor de silenciamiento p19 que podría influir en los resultados obtenidos en este trabajo, como control se utilizaron plantas agroinfiltradas con los reporteros junto a P19 en trans. El promotor CaMV35S no posee sitios reconocidos por LEC2 por lo que los efectos en la expresión de los reporteros son indirectos y bajo nuestra hipótesis de trabajo se deben a la inducción de la expresión de genes involucrados en el desarrollo de semilla (Figura II.3).

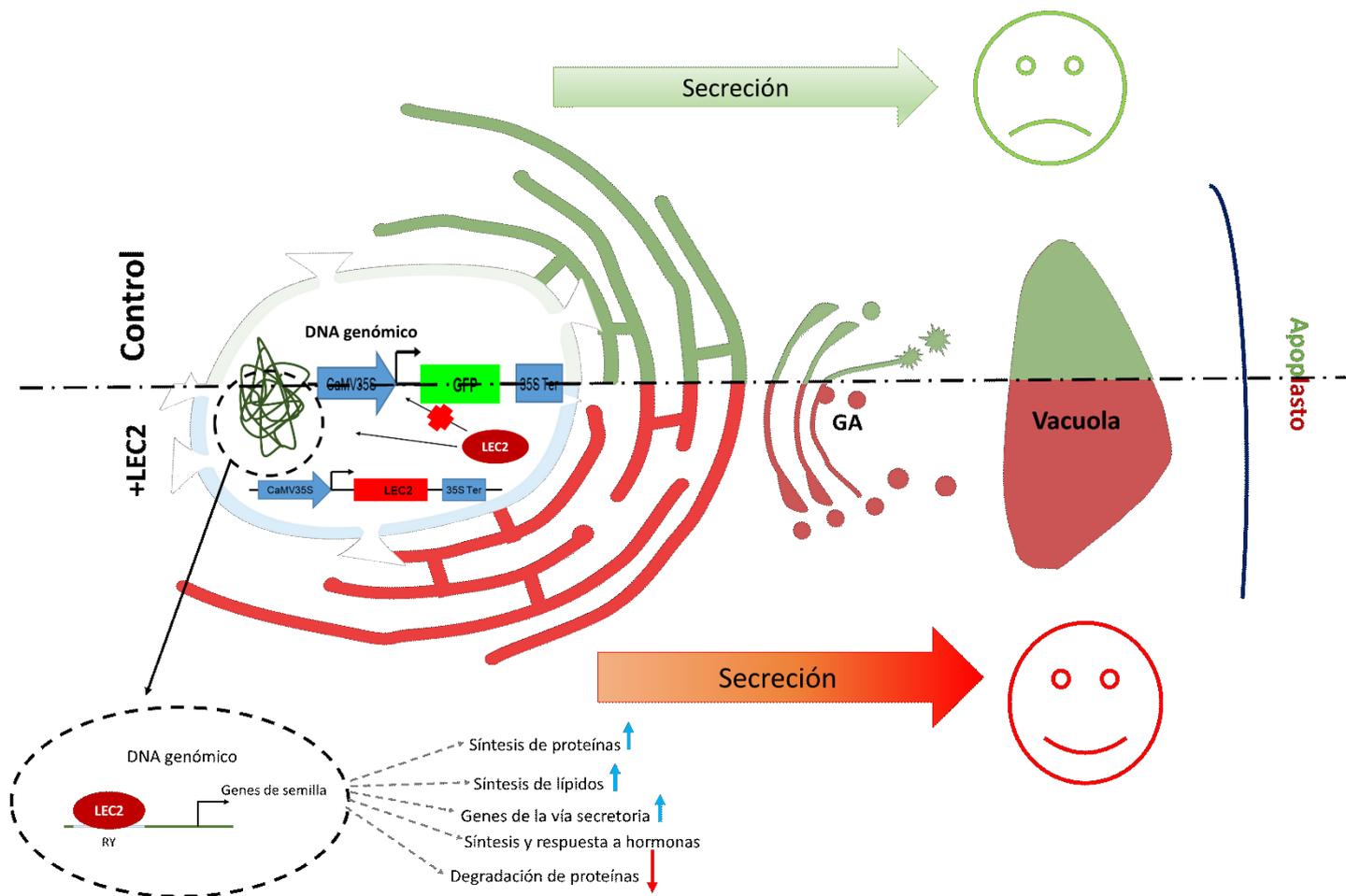


Figura II.3. Diseño experimental.

La producción de proteínas recombinantes en la vía secretoria de todos los sistemas de expresión está limitada por la capacidad de plegamiento y transporte (Control). El gen LEC2 de *Arabidopsis thaliana* y los reporteros utilizados se expresaron bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S (+LEC2). El promotor CaMV35S no posee sitios reconocidos por LEC2 (cruz roja) por lo que los efectos en la expresión de los reporteros son indirectos y bajo nuestra hipótesis de trabajo se deben a la inducción de la expresión de genes involucrados en el desarrollo de semilla (flechas grises punteadas). En rojo se marcan los compartimentos de la vía que se considera se verán afectados por la expresión de LEC2. El dibujo no está a escala.

Con la finalidad de poner a punto las condiciones de agroinfiltración se realizaron ensayos de expresión transitoria por infiltración de *Agrobacterium tumefaciens* que portaba el gen del marcador de ER, GFP-HDEL (ER-GFP) en ausencia y presencia de LEC2 utilizando diferentes DO de infiltración para LEC2 en hojas de *N. benthamiana*. Se optaron por dos metodologías distintas, agroinfiltración conjunta de LEC2 junto al marcador de ER o agroinfiltración inicial de LEC2 y posterior agroinfiltración con ER-GFP junto a LEC2. Los niveles de acumulación fueron analizados entre los 3 – 10 dpi por inmunoblot en condiciones reductoras utilizando un anticuerpo específico contra GFP.

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. La intensidad de las bandas de GFP fueron cuantificadas por densitometría, como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. De esta forma se determinó que las mejores condiciones para el ensayo eran agroinfiltración conjunta del reportero junto a LEC2 y que los mayores niveles de acumulación se obtenían entre los días 4 – 8 post-infiltración sin que se observaran efectos negativos sobre la planta.

2.3. Efecto de LEC2 sobre los niveles de acumulación de proteínas reporteras

La Figura II.4 muestra el impacto de LEC2 en la acumulación de ER-GFP observándose un incremento promedio de 2,5 – 3,5 veces. En presencia de LEC2, la banda correspondiente a la proteína GFP puede observarse en un gel teñido con Coomassie Blue siendo una de las bandas más importantes (Figura II.4A, calle 2), el rendimiento estimado para ER-GFP en estas condiciones fue de 759,23 $\mu\text{g/g}$ hoja fresca. Estos ensayos se repitieron para proteínas dirigidas a vacuolas observándose incrementos de 3 – 7 veces.

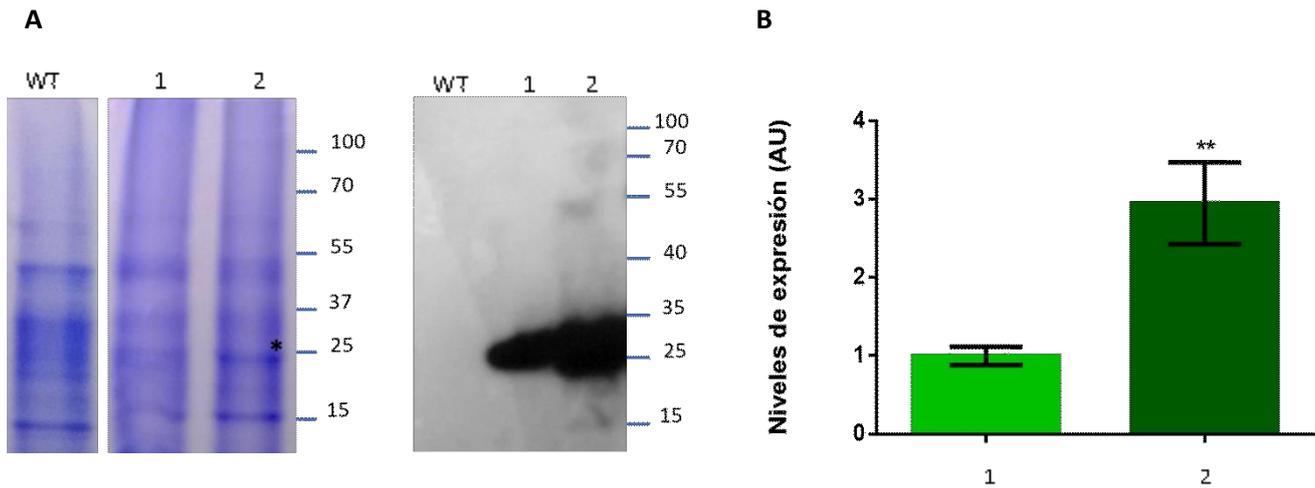


Figura II.4. Efecto del factor de semilla LEC2 sobre la acumulación de ER-GFP.

A) Los cambios en la acumulación de ER-GFP en presencia y ausencia de LEC2 fueron analizados por SDS-PAGE e inmunoblot empleando un anticuerpo contra GFP. La calle WT corresponde a un extracto de hojas infiltradas con agua, la calle 1 corresponde a extractos de hojas infiltradas con agrobacterias que portaban las construcciones P19 y ER-GFP y la calle 2 corresponde a hojas infiltradas con agrobacterias que portaban las construcciones ER-GFP y LEC2. El asterisco en la calle 2 indica una banda que no se observa en el WT y ausente en la calle 2 que corresponde a GFP como indica el inmunoblot.

B) Para cuantificar el efecto de LEC2 se analizó la intensidad de las bandas obtenidas en el inmunoblot utilizando el software ImageJ. El histograma muestra los valores obtenidos para 3 experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar de la media. ** denota diferencia estadísticamente significativa por el Test de Student ($p \leq 0,01$). La acumulación de GFP se incrementó de 2,5 – 3,5 veces en presencia de LEC2.

2.4. Efectos de LEC2 sobre marcadores de la vía secretoria

Las células de semillas en desarrollo cuentan con una vía secretoria ampliamente desarrollada coherente con la gran cantidad de moléculas que sintetizan, por lo que son comparables con otras células secretorias profesionales como por ejemplo las células plasmáticas de mamíferos, es por ello que se evaluaron los efectos de LEC2 sobre el desarrollo de la vía secretoria.

Para evaluar el efecto de LEC2 sobre el funcionamiento de la vía secretoria se realizaron ensayos de expresión transitoria de diferentes marcadores fluorescentes (Figura II.5): ER-GFP (i), GA-GFP (ii), PVC-GFP (iii) y vac-RFP (iv) en presencia y ausencia de LEC2 y su localización subcelular fueron analizadas por CLSM.

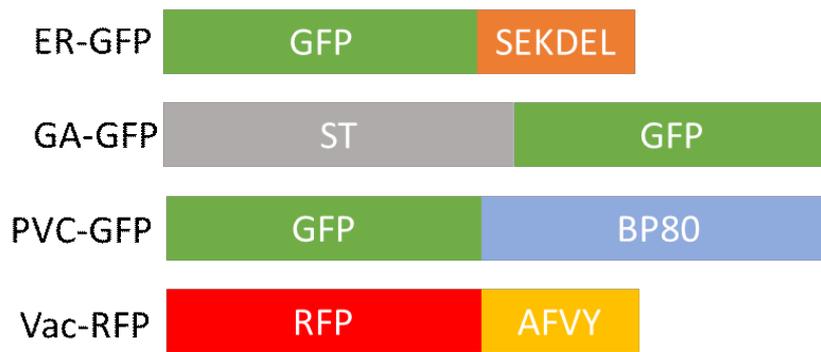


Figura II.5. Esquema de los marcadores de la vía secretoria utilizados.

Los marcadores de la vía secretoria utilizados son: GFP fusionada a la señal de retención en el ER SEKDEL, ER-GFP; GFP fusionada a la región N-terminal de la enzima α 2,6-sialiltransferasa (ST) presente en el GA, GA-GFP; GFP fusionada al receptor de direccionamiento vacuolar BP80, PVC-GFP y RFP fusionada a la señal de direccionamiento vacuolar AFVY de la faseolina, vac-RFP.

ER-GFP (marcador del ER) y ST-GFP (marcador del Golgi) presentaron el mismo patrón de localización en ausencia y en presencia de LEC2 (Figura II.6, ER-GFP y GA-GFP, control y + LEC2). En cambio, el marcador de PVC GFP-BP80 en ausencia de LEC2 genera estructuras altamente móviles que poseen forma de puntillado o tubulares y las cuales sufren una relocalización al apoplasto en presencia del factor de transcripción LEC2. A su vez, el marcador de vacuola, vac-RFP presentó una fuerte fluorescencia roja en el lumen de la vacuola central en ausencia de LEC2 y presentó la misma relocalización al espacio apoplástico que PVC-GFP en presencia de LEC2 (Figura II.6). Este último resultado es comparable al observado al expresar otras proteínas vacuolares junto a LEC2.

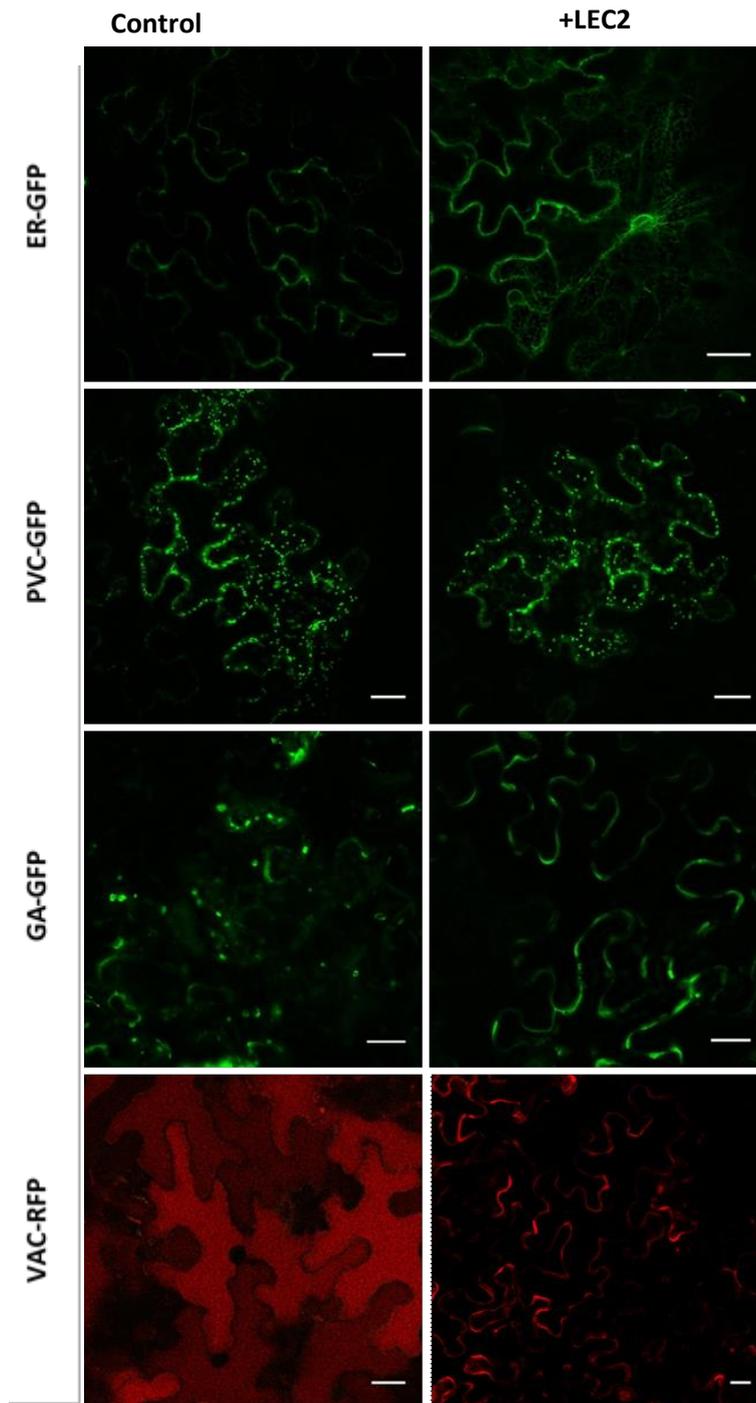


Figura II.6. Localización subcelular de los marcadores de la vía secretoria en presencia de LEC2. ER-GFP y GA-GFP presentaron el mismo patrón de localización en presencia y ausencia de LEC2. Mientras que PVC-GFP y vac-RFP se relocalizaron en el apoplasto en presencia de LEC2. Escala de la barra 25 μm .

2.5. Análisis del efecto estabilizante de LEC2

Debido a que la expresión de LEC2 no sólo generó la secreción de proteínas vacuolares y de PVC, sino también un aumento en los niveles de acumulación, se decidió estudiar si esto se debió a un cambio de las propiedades del apoplasto. Para ello se estimó el pH del apoplasto *in vivo* mediante microscopía confocal. Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* Apo-pHusion que expresan de forma estable la proteína quimérica mRFP1–EGFP, direccionada a apoplasto, donde funciona como sensor de pH apoplástico. Con esta finalidad se estimó el pH en plantas Apo-pHusion sin infiltrar y en plantas que se infiltraron con *Agrobacterium tumefaciens* que portaban el vector vacío y el gen LEC2. Para calcular el promedio de pH de la hoja, se estimó el pH para cada región de interés (ROI) de acuerdo con las relaciones de intensidades de fluorescencia entre EGFP y mRFP. Se realizaron más de 35 medidas independientes en distintas hojas por cada condición y se promediaron.

Se observó un aumento del pH apoplástico en hojas infiltradas con LEC2. Mientras que el pH promedio en las hojas control fue de $5,53 \pm 0,05$, el valor de pH en hojas infiltradas con el vector vacío fue en promedio de $5,88 \pm 0,27$ y en hojas que expresan LEC2 alcanza un valor de $7,13 \pm 0,21$ (Figura II.11). Este aumento de pH podría explicar la estabilización de las proteínas en el apoplasto.

Teniendo en cuenta que se ha informado que el apoplasto es un compartimiento proteolítico y se ha atribuido a proteasas de este compartimiento la degradación de proteínas foráneas (Jutras y col 2015b, Robert y col 2016, Benchabane y col 2008b, Jutras y col 2018), se decidió evaluar si LEC2 afecta la actividad proteolítica total de extractos de plantas de *N. benthamiana*. Plantas de *N. benthamiana* fueron infiltradas con *A. tumefaciens* portando un vector vacío o LEC2 y a los 5 dpi se evaluó la actividad proteolítica total de extractos de los extractos de hojas utilizando el método de la azocaseína. Como control se utilizó un extracto de hojas sin infiltrar. Como se observa en la tabla II.1, la actividad proteolítica total de extractos de hojas infiltradas con LEC2 fue un 25% del valor obtenido para hojas sin infiltrar. Las hojas infiltradas con agrobacterias llevando el vector vacío poseían una actividad proteolítica del 50% de los controles.

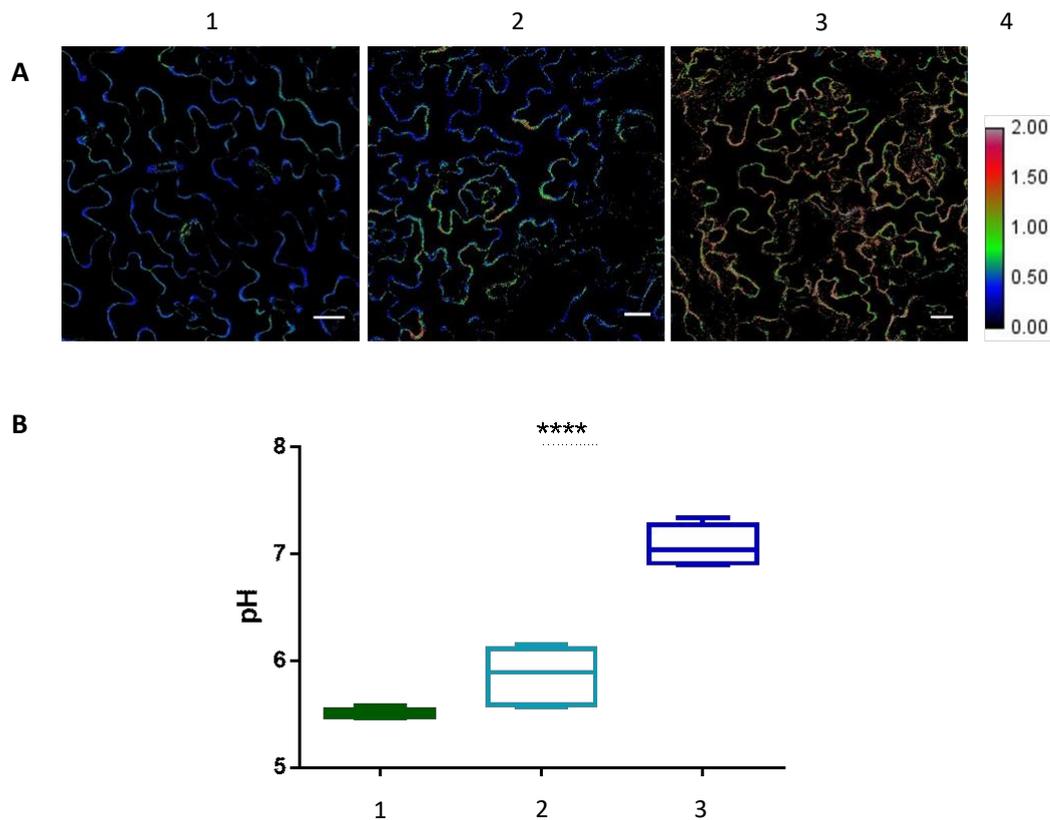


Figura II.7. Efecto de LEC2 sobre el pH del apoplasto.

Análisis *in vivo* de pH apoplástico utilizando la línea de Arabidopsis que expresa de forma estable el sensor de pH apoplástico apo-mRFP1-EGFP. El pH fue estimado de acuerdo con las relaciones de intensidades de fluorescencia entre EGFP y mRFP (ratio EGFP/mRFP) para cada región de interés (ROI). A) imágenes de relación de intensidad representativas de la epidermis de hojas. (1) hojas sin infiltrar, (2) hojas infiltradas con el vector vacío y (3) hojas infiltradas con LEC2. El panel 4 muestra la escala de pseudocolor de relaciones de fluorescencia. Escala de la barra 25 μ m.

B) Gráfico de pH de las diferentes condiciones. Las barras representan error estándar de la media. **** Denota diferencia estadísticamente significativa por test de Tukey ($p \leq 0.0001$). el pH promedio en las hojas control fue de $5,53 \pm 0,05$, el valor de pH en hojas infiltradas con el vector vacío fue en promedio de $5,88 \pm 0,27$ mientras en hojas que expresan LEC2 alcanza un promedio de $7,13 \pm 0,21$

Tabla II.1. Actividad proteolítica en presencia de LEC2

Muestra	Actividad proteolítica (%)
WT	100
Vector vacío	$46,25 \pm 7,21$
LEC2	$23,50 \pm 11,2$

2.6. Efecto de LEC2 sobre los rendimientos y rutas de transporte seguida por las diferentes variantes del mAb 14D9

2.6.1. Localización subcelular

Se analizó el transporte de un anticuerpo completo dirigido a distintos compartimientos de la vía secretoria. Al expresar sec-LC-RFP y sec-HC, se observa un patrón apoplástico tanto en ausencia como en presencia de LEC2 (Figura II.8, sec-Ab), lo cual indicaría que la expresión de LEC2 no afecta la localización final de sec-Ab-RFP. Por otro lado, cuando se co-expresan sec-LC-RFP con vac1-HC o vac2-HC en ausencia de LEC2 se observó una intensa fluorescencia roja (mostrada en magenta) en el lumen de la vacuola central (Figura II.8, vac1- y vac2-Ab). Las proteínas vac1- y vac2-Ab-RFP no colocalizan con ER-GFP, ni siquiera alrededor de la envoltura nuclear (Figura II.8, vac1- y vac2-Ab, control). En cambio, ambas proteínas en presencia de LEC2 dan un patrón de fluorescencia irregular rojo en el borde de la célula que no colocaliza con ER-GFP lo que indica que se encuentra el apoplasto (Figura II.8, vac1- y vac2-Ab + LEC2). Este resultado fue observado también al expresar otros marcadores vacuolares como por ejemplo RFP-AFVY (Scabone et al, 2011), GFP-KISIA y GFP-NIFRGF, lo que sugiere que LEC2 favorece la secreción de proteínas dirigidas a vacuolas. En contraste, al expresar sec-HC-RFP junto a ER-HC sin LEC2 se observa un patrón típico de retículo endoplásmico y colocalización con ER-GFP (Figura II.8, ER-Ab, control, el color blanco proviene de la fusión de los canales verde de GFP y magenta de RFP). Sin embargo, a diferencia de los observado para ER-GFP, al expresar a ER-Ab-RFP junto a LEC2 se observa que el anticuerpo queda parcialmente retenido en el ER, pero es a su vez es transportado al lumen de la vacuola central y parcialmente secretado (Figura II.8, ER-Ab+LEC2).

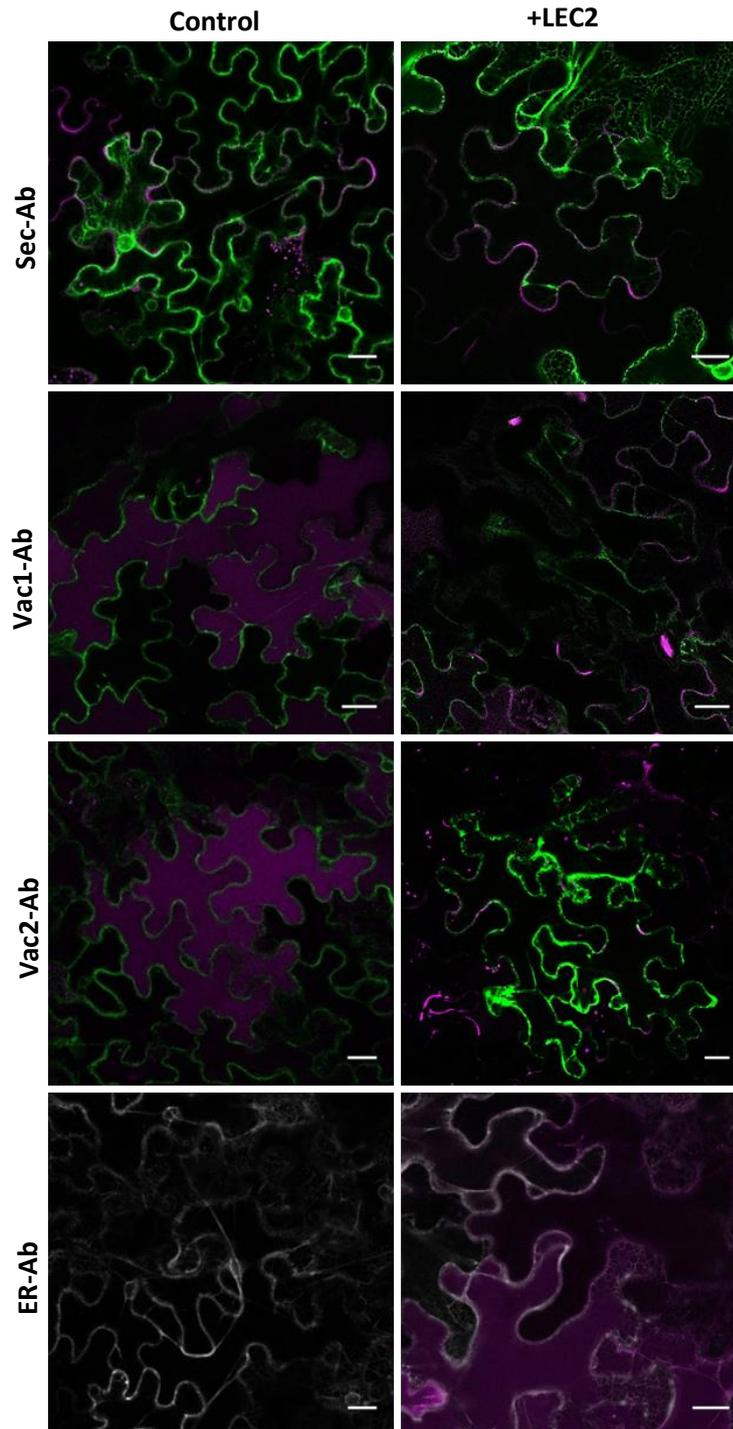


Figura II.8. Efecto del factor de semilla LEC2 sobre la localización subcelular de diferentes mAbs direccionados a diferentes compartimentos de la vía secretoria.

En el canal verde se presenta ER-GFP y en el violeta se presenta el mAb-RFP dirigido al apoplasto (sec-Ab), a vacuola central empleando la secuencia Ct KISIA (vac1-Ab) o ss NIFRGF (vac2-Ab) y fusionado a la secuencia de retención al ER KDEL (ER-Ab). En blanco se observa la colocalización del mAb con GFP. En presencia de LEC2 se observa un incremento de sec-Ab en el apoplasto, una relocalización de vac1-Ab y vac2-Ab que deja de observarse en la vacuola central y presenta una distribución irregular con los bordes celulares que no colocaliza con el marcador de ER, típico de localización en apoplasto. ER-Ab también se relocaliza en presencia de LEC2, observándose no solo en el ER sino también en el apoplasto y vacuola central. Escala de la barra 25 μm .

2.6.2. Glicosilación de las diferentes variantes de los mAbs

Debido a la relocalización observada de los mAbs en presencia de LEC2, se decidió estudiar el perfil de glicanos de los mismos en presencia de LEC2. Con esta finalidad, los anticuerpos fueron purificados de hojas utilizando cromatografía de afinidad con proteína G. Antes de evaluar las modificaciones postraduccionales de las distintas formas del anticuerpo, se estudió la integridad y pureza de los mismos.

La pureza de los anticuerpos obtenidos se evaluó por SDS-PAGE y por inmunoblot en condiciones reductoras.

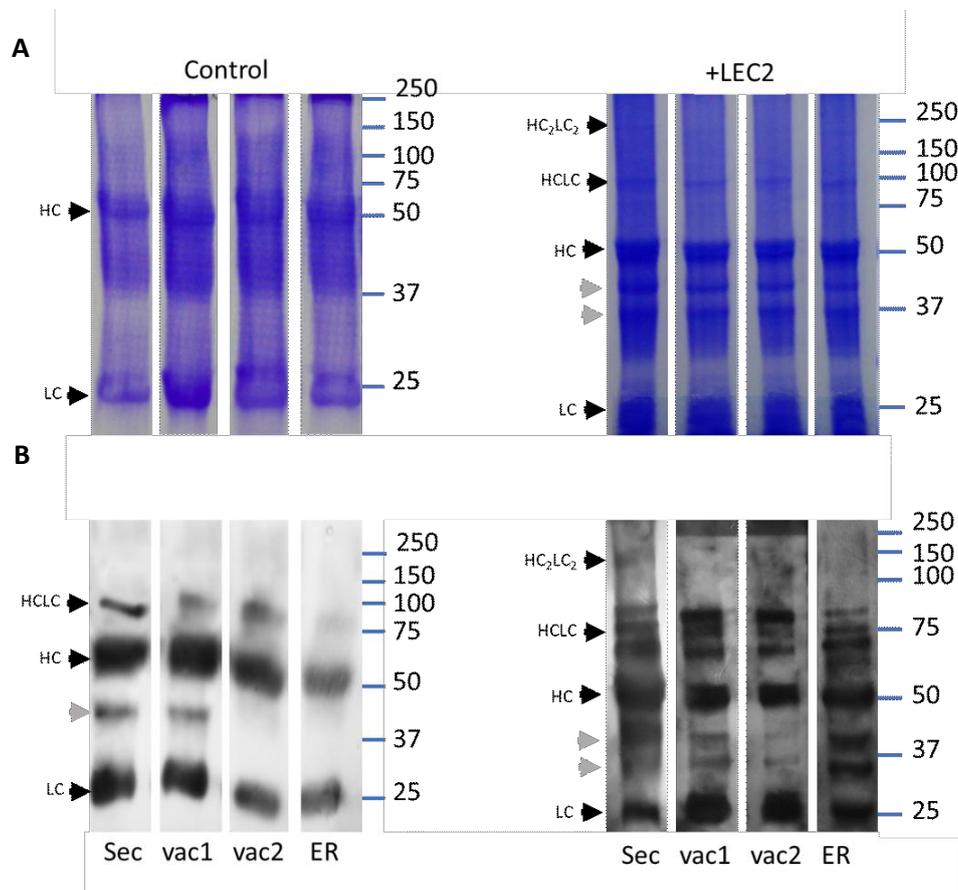


Figura II.9. Integridad y pureza de los anticuerpos purificados desde hojas.

A) SDS-PAGE en condiciones reductoras.

B) Inmunoblot de los anticuerpos purificados en condiciones reductoras y analizados con suero anti inmunoglobulinas de ratón.

Las flechas negras indican las cadenas polipeptídicas HC (52 kDa) y LC (25 kDa) o distintos estados de oligomerización de las mismas. En gris se señalan posibles productos de degradación de HC. Los pesos moleculares se indican en kilo-Dalton.

En ausencia de LEC2 solo se observan dos bandas de 52 y 25 kDa, correspondientes a HC y LC (flechas negras), respectivamente. Por el otro lado, en presencia de LEC2 se observan, además, bandas de peso molecular superiores a 50 kDa, posiblemente resultado de una reducción incompleta de los puentes disulfuro y que representarían distintos estados de agregación entre HC y LC. A su vez, se observan bandas intermedias que son reconocidas por el suero anti-IgG de ratón que corresponderían a productos de degradación de HC (flechas grises). Este resultado concuerda con el observado para sec-Ab y ER-Ab producidos en semillas (Petruccelli y col 2006b). Hay que remarcar que, a pesar de la degradación observada, estos productos representan un porcentaje bajo respecto a los rendimientos obtenidos al expresar a los mAbs junto LEC2 por lo cual no implicarían una desventaja de la estrategia estudiada. La tabla II.2 muestra los rendimientos de purificación para las diferentes variantes del mAb en presencia y ausencia de LEC2.

Tabla II.2. Rendimientos de purificación

mAb	Rendimientos ($\mu\text{g/g}$ hoja fresca)	
	Control	+LEC2
Sec-Ab	11	179
Vac1-Ab	107	536
Vac2-Ab	126	380
ER-Ab	97	363

Los resultados anteriores nos permiten concluir que se obtuvieron niveles de pureza suficientes para estudios posteriores de glicosilación ya que todas aquellas bandas observadas por tinción para proteínas son también reveladas con un anticuerpo específico de inmunoglobulinas de ratón.

La glicosilación de los polipéptidos purificados a partir de extractos de hojas fue estudiada inmunoblot con sueros específicos de glicanos complejos de plantas: β 1,2-Xilosa (β 1,2-Xyl), α 1,3-Fucosa (α 1,3-Fuc) y Lewis a (Le^a) (Figura II.10).

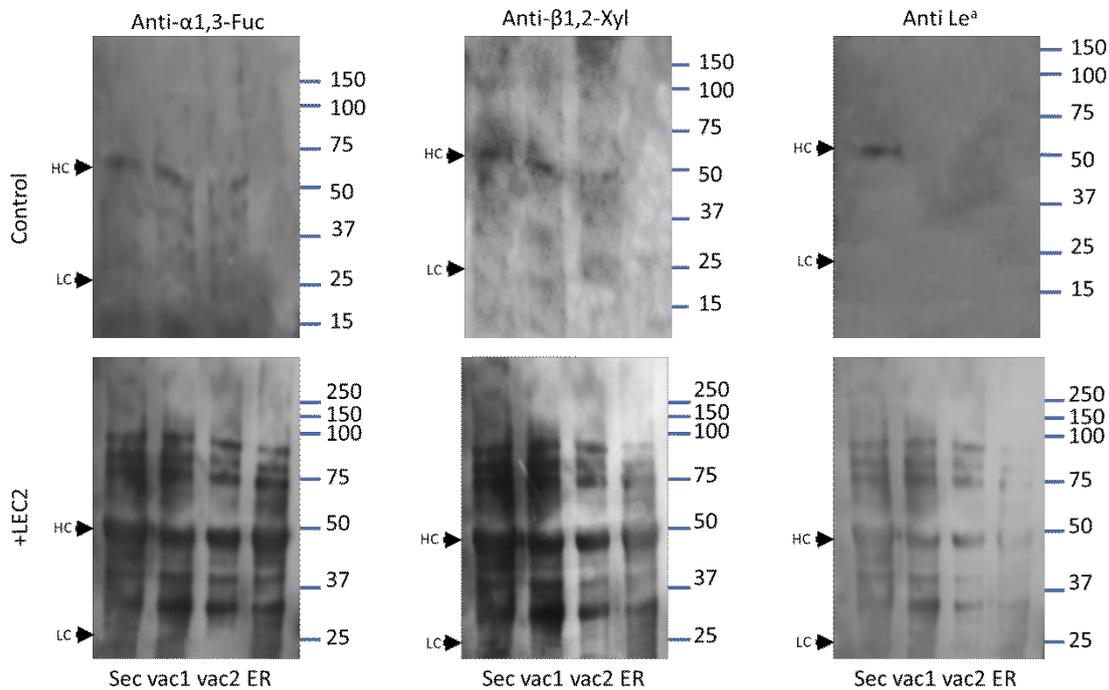


Figura II.10. Análisis del grado de glicosilación mediante inmunoblot

β 1,2-Xilosa (β 1,2-Xyl); α 1,3-Fucosa (α 1,3-Fuc) y Lewis a (Le^a). Las flechas negras indican las cadenas LC (25 kDa) la cual se encuentra ausente y HC (52 kDa). Los pesos moleculares se indican en kilo-Dalton.

El análisis de glicanos mostró que, en el caso de sec-Ab el mismo presentó glicanos complejos que contienen xilosa, fucosa y epítipo de Lewis a, tanto en presencia como en ausencia de LEC2, este resultado es el esperado para proteínas extracelulares que pasaron por el trans-Golgi, lugar donde los glicanos complejos son adicionados. En el caso de las versiones vacuolares, en ausencia de LEC2, ambos presentan glicanos complejos que contienen xilosa y fucosa, pero no glicanos de Lewis a. En presencia de LEC2 ambos presentan, además de glicanos con xilosa y fucosa, epítipes de Lewis a, teniendo en cuenta que este motivo es encontrado únicamente en proteínas localizadas en el apoplasto, esto indica que los vac-Abs en presencia de LEC2 pasaron por el trans-Golgi y fueron correctamente secretados. ER-Ab, no posee glicanos complejos en ausencia de LEC2, indicado que este no alcanzó el trans-Golgi, lo cual indica una correcta retención en el ER o recuperación desde el cis-Golgi, sin embargo, en presencia de LEC2 se observa presencia de glicanos con xilosa y fucosa y, en menor medida, de epítipes

de Lewis a, lo cual indica que el transporte a vacuola y/o la parcial secreción ocurrirían por una vía Golgi-dependiente.

2.6.3. Niveles de acumulación de las diferentes variantes del mAb14D9

Los niveles de acumulación de las distintas variantes de los mAbs fueron analizados por ELISA tipo sándwich como se explicó en el capítulo I en ausencia y presencia de LEC2 (Figura II.11).

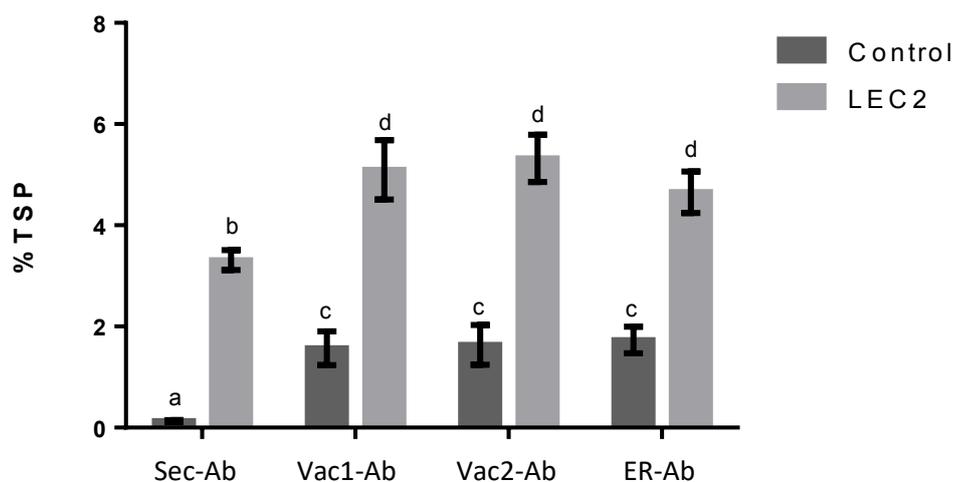


Figura II.11. Efecto de LEC2 sobre las diferentes variantes del mAb 14D9.

Niveles de acumulación de las diferentes versiones del Ab en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*. Los niveles de acumulación fueron cuantificados por ELISA sándwich en tres replicados biológicos y fueron expresados como % de la proteína total soluble (TSP). Las barras de error representan error estándar de la media. En presencia de LEC2 los niveles del anticuerpo fueron 5 – 8 veces mayores para el caso de sec-Ab, 2,5 – 4 veces mayores para ER-Ab y 3 – 4,5 veces mayores para vac1 y vac2-Ab. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas por el test de Tukey ($p \leq 0.001$).

Los niveles de expresión obtenidos en ausencia de LEC2 para ER y vacs-Abs fueron similares entre ellos y entre 10 - 15 veces mayores que los niveles observados para la versión secretoria, resultado que concuerda con el obtenido previamente. En presencia de LEC2 los niveles fueron 5 – 8 veces mayores para el caso de sec-Ab, 2,5 – 4 veces mayores para ER-Ab y 3 – 4,5 veces mayores para vac1 y vac2-Ab, siendo los niveles de sec-Ab superiores a los obtenidos a los vac-Abs y ER-Ab, y sólo 1,2 – 1,7 veces inferiores a los de estos anticuerpos expresados junto a LEC2.

Estos resultados indican que la expresión de LEC2 genera aumentos en los niveles de expresión de las diferentes variantes del Ab, siendo más marcado el efecto en el anticuerpo secretorio.

3. Discusión

Con el creciente desarrollo y popularidad de las plantas como sistema de expresión, en los últimos años se han desarrollado diversas estrategias con el fin de aumentar la síntesis de proteínas recombinantes y elevar los rendimientos de producción (Ullrich y col 2015, Benchabane y col 2008b, Moustafa y col 2016). La producción de proteínas recombinantes en la vía secretoria de todos los sistemas de expresión está limitada por la capacidad de plegamiento y transporte (Delic y col 2014, Shaffer y col 2004). Diversas estrategias se utilizan para incrementar la capacidad de sintetizar proteínas que, para alcanzar una conformación activa y soluble, requieren de un procesamiento típico de la vía secretoria (Huang y col 2018, Xiao y col 2014, Dinnis y James, 2005, Gulis y col 2014, Kaufmann, 2014). Algunas de estas estrategias involucran la expresión de reguladores claves como es el caso del factor XBP-1 (*X-box binding Protein-1*) en células de mamífero que participa en la diferenciación de las células B en células plasmática (Dinnis y James, 2005, Pybus y col 2014). Estas células al igual que las que conforman la glándula mamaria son ejemplos de células secretorias “profesionales” que se caracterizan por el gran desarrollo de la vía secretoria y una activación de vías metabólicas tales como las que intervienen en la síntesis de aminoácidos, producción de energía, plegamiento de proteínas y control de calidad. Aunque en el área del molecular farming, la mayoría de las proteínas de interés farmacéutico e industrial, requieren de modificaciones producidas a lo largo de la vía secretoria, poco se conoce en plantas sobre el desarrollo de esta vía, por lo que este tipo de estrategias aún no han sido exploradas. En el reino vegetal las células que integran el embrión y endosperma constituyen ejemplos de células secretorias profesionales por su gran capacidad de sintetizar y almacenar proteínas y triglicéridos. Considerando que: LEC2 es uno de los reguladores centrales del desarrollo y maduración de semillas en *Arabidopsis thaliana*, junto a LEC1, ABI3 y FUS3 poseyendo funciones parcialmente redundantes (Carbonero y col 2017) y que estos tres factores de transcripción forman parte de la misma subfamilia denominada AFL, la cual porta un dominio de unión al DNA tipo B3 específico de plantas (Carbonero y col 2017); que la expresión ectópica de LEC2 induce la formación de embriones somáticos en tejidos vegetativos al inducir la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de auxinas (Braybrook y Harada, 2008, Braybrook y

col 2006, Wojcikowska y col 2013); que se ha mostrado que es capaz de modificar las características de la vacuola central de la hoja generando vacuolas más pequeñas del tipo de las PSV encontradas en semilla (Feeney y col 2013a, Feeney y col 2013b), estrategia que ha sido descrita como de estabilización por direccionamiento a PSV inducidos en tejidos vegetativos (Saberianfar, 2018), se concluye que LEC2 y otras proteínas AFL son reguladores maestros que promueven procesos metabólicos que requieren de un mayor suministro de energía y desarrollo de la vía secretoria. Es por ello que en este capítulo se realizó un análisis del impacto de expresar LEC2 de manera transitoria bajo un promotor constitutivo en hojas de *N. benthamiana* en la acumulación y ruta de transporte seguida por proteínas heterólogas. Los estudios realizados con la versión reportera GFP-LEC2 mostraron que LEC2, a pesar de provenir de una especie diferente, alcanzó correctamente el núcleo, lugar donde podría realizar sus funciones efectoras. A pesar de esto, debido a que la fusión a GFP podría intervenir con las propiedades y la capacidad de unión al DNA y de formar heterodímeros con otros factores de transcripción, se decidió continuar los estudios con la versión de LEC2 nativa, sin ningún polipéptido adicional que pudiese generar interacciones aberrantes.

Los estudios realizados posteriormente con el gen LEC2 permitieron optimizar su utilización en sistemas de expresión temporal en hojas de *N. benthamiana*. Utilizando esta plataforma se mostró que la sobreexpresión de LEC2 generó aumentos de 2,5 – 3,5 veces para el caso de ER-GFP, cuya banda pudo observarse en un SDS-PAGE teñido utilizando Coomassie Blue, siendo una de las mayoritarias. Además, se mostró que en los tiempos empleados 4 – 8 dpi no se producen efectos negativos en el desarrollo de la hoja como si habían sido observados cuando se generan plantas transgénicas de LEC2 empleando un promotor constitutivo (Harada y col 2001, Harada y col 2002, Stone y col 2001, Stone y col 2008). Estos ensayos se repitieron para proteínas dirigidas a vacuola y apoplasto observándose incrementos de 3 – 7 y de 5 – 8 veces, respectivamente. Resulta especialmente remarcable los aumentos observados al producir a las diferentes variantes del mAb14D9 en presencia de LEC2, debido a que esta es una proteína compleja que requiere la presencia de foldasas, proteínas disulfuro isomerasas y diferentes chaperonas para su correcto plegado, ensamblado y transporte, todas las variantes del anticuerpo se acumularon en mayores niveles en presencia de LEC2, siendo el aumento de la variante secretoria el mayor y los niveles del mismo se

volvieron comparables respecto a las versiones de ER y vacuola en presencia de LEC2 y superiores a estas dos versiones en la situación control, representando una mejora significativa en el sistema. Estos resultados son importantes, ya que el direccionamiento a distintos compartimientos de la vía secretoria es una estrategia empleada para estabilizar proteínas que interfieren en el metabolismo de la célula vegetal, son tóxicas o son sensibles a proteasas presentes en el apoplasto (Petruccelli, 2019, Marin Viegas y col 2017).

Para analizar el impacto de LEC2 en el funcionamiento de la vía secretoria se comparó la localización subcelular analizada por microscopia confocal de diferentes marcadores fluorescentes en ausencia y en presencia de LEC2. ER-GFP y GA-GFP presentaron la misma localización en ausencia y en presencia de LEC2. En cambio, PVC-GFP y vac-RFP se relocalizaron en el apoplasto. También se analizó el transporte de un anticuerpo completo dirigido a distintos compartimientos de la vía secretoria. Al expresar sec-Ab-RFP, se observó un patrón apoplástico tanto en ausencia como en presencia de LEC2, lo cual indicaría que la expresión de LEC2 no afecta la localización final de proteínas secretorias. Por otro lado, al igual que lo observado para vac-RFP, vac1- y vac2-Ab-RFP en ausencia de LEC2 se localizaron en el lumen de la vacuola central. En cambio, en presencia de LEC2 se encuentra en el apoplasto. Este resultado sugiere que LEC2 favorece la secreción de proteínas dirigidas a vacuolas. ER-Ab-RFP sin LEC2 colocalizó con ER-GFP en el retículo endoplásmico. Sin embargo, a diferencia de lo observado para ER-GFP, al expresar a ER-Ab-RFP junto a LEC2 se observa que el anticuerpo queda parcialmente retenido en el ER, pero es a su vez es transportado al lumen de la vacuola central y parcialmente secretado. Esta diferencia observada respecto a ER-GFP podría deberse a la inestabilidad que presenta GFP en la vacuola por lo cual sería adecuado repetir el ensayo utilizando RFP como marcador del ER (Tamura y col 2003).

Para entender mejor los cambios en la vía de transporte seguidas por estos anticuerpos en presencia de LEC2 se realizó un análisis de presencia de N-glicanos complejos (que son producidos en el trans-Golgi) mediante inmunoblot. En las proteínas ER-Ab, vac1 y vac2c-Ab producidas en presencia de LEC2 se observó un incremento de los mismos en relación los obtenidos en ausencia de LEC2. Esto podrían indicar un mayor transporte por vía de Golgi dependiente de los vac-Ab y, siguiendo la hipótesis generada

en el Capítulo I según la cual el transporte a vacuola por la vía Golgi-Independiente se debe a una saturación del sistema del transporte, estos datos podrían indicar que LEC2 genera una activación del sistema de secreción. A su vez, se observó la presencia de glicanos de Lewis a, típicos de proteínas extracelulares. ER-Ab producido en hojas presenta mayoritariamente glicanos ricos en manosa (Ocampo y col 2016a, Petruccelli y col 2006b), pero el obtenido de semillas tabaco posee N-glicanos complejos y localiza en PSV (Petruccelli y col 2006b). En el caso del ER-Ab producido en presencia de LEC2 se observó que el mismo presenta mayoritariamente glicanos complejos conteniendo xilosa y fucosa indicando que el mismo siguió su ruta de transporte de una manera Golgi-dependiente, y en menor proporción epítopes de Le^a, lo cual concuerda con lo observado que solo una porción de las moléculas son eficientemente secretadas. En semillas la secuencia C-terminal KDEL muestra un comportamiento dual ya que Ab-KDEL producido en semilla de tabaco es almacenado en PSV y parcialmente secretado (Petruccelli y col 2006b). El almacenamiento de proteínas recombinantes con la señal KDEL en compartimientos de almacenamiento en semillas ha sido reportado previamente. Fragmentos simple cadena (scFv-T84.66-KDEL) fueron localizados en PB tipo I y II derivados del ER en endosperma de arroz (Torres y col 2001). Asimismo, en semillas de tabaco la expresión de faseolina con dicha secuencia (Pueyo y col 1995) fue encontrada en PSV y dirigida por una vía Golgi dependiente, aunque en estos casos no se observó secreción. Un resultado similar fue observado al expresar al mAb 2G12 en semillas en desarrollo de Arabidopsis (Loos y col 2011c, Loos y col 2011a). La secreción de Ab-KDEL podría deberse posiblemente al direccionamiento mediado por KDEL y a una saturación parcial de la maquinaria de transporte (Crofts y col 1999), lo que determina importantes diferencias en la retención y el direccionamiento vacuolar entre hojas y semillas. Dado que la secuencia KDEL sigue las reglas de señales vacuolares Ct-VSS, la presencia de glicanos complejos en ER-Ab sería un indicio de la activación de las vías de transporte de semillas en desarrollo. En cambio, la secreción de los vac-Ab y los marcadores fluorescentes de vacuola utilizados, indicarían que estas proteínas seguirían una vía de transporte diferente o que los receptores involucrados en el reconocimiento y direccionamiento de estas señales y la secuencia KDEL son diferentes. Además, la eficiencia de un único VSS en el transporte a vacuola es cuestionada debido a la existencia de proteínas que poseen más de un VSS. Por ejemplo, se ha demostrado que

la región Ct de la subunidad alfa de la beta-conglicina de soja posee dos VSS, uno Ct y otro ss, ambos dirigiendo a la proteína a PSV, pero no es claro si los mismos funcionan de manera redundante o si interaccionan con el mismo VRS (Nishizawa y col 2006). La existencia de más de un VSS en la misma proteína podría deberse a una estrategia para regular el transporte a vacuolas en diferentes tejidos y estados de desarrollo. También se ha propuesto que a relación entre el número de VSS y el tamaño de la proteína que los porta juega un rol en la eficiencia de direccionamiento (Nishizawa y col 2006). A su vez, otro tema de discusión se relaciona a la ruta de transporte a vacuolas que algunas proteínas toman en órganos específicos y como esas rutas cambian según el estado metabólico de la célula. Se ha observado que algunas proteínas, como la Cardosina A, pueden ser secretadas o direccionadas a la vacuola, acumulándose en PSV o LV mediante vías de transporte diferentes dependiendo del tipo celular y del estadio de desarrollo, lo cual indicaría la existencia de mecanismos de regulación finos en las vías de transporte y la existencia de especificidad de las mismas en distintos órganos (Pereira y col 2014, Oliveira y col 2010, Pereira y col 2013, Robinson y col 2005). A esto se le suma la existencia de mecanismos de secreción no convencionales que involucran al MVB (Wang y col 2017), la relación del mismo en procesos de direccionamiento a vacuola en la autofagia (Cui y col 2018) y la fusión del MVB y la vacuola con la membrana plasmática durante el ataque de patógenos (Wang y col 2017). La contribución de las diferentes vías en el transporte de proteínas a vacuolas o su posible secreción dependerá del tipo celular y de los requerimientos celulares, así como del estadio de desarrollo y condiciones externas. Algunas vías pueden ser encontradas en todos los tipos celulares mientras que otras se asocian con funciones especializadas de un tipo celular y con transiciones entre tipos celulares, así como cambios generales que ocurren en los diferentes estadios de desarrollo y las condiciones del entorno. Teniendo esto en cuenta, la secreción observada para proteínas vacuolares podría indicar la activación de vías que no se encuentran normalmente en la hoja y sería adecuado realizar ensayos adicionales para comprender las diferencias observadas entre ER-Ab y las proteínas vacuolares utilizadas.

La expresión ectópica de LEC2 generó no sólo la secreción de proteínas vacuolares, sino también un aumento de sus niveles de acumulación, esto podría deberse a un aumento en la capacidad de síntesis y secreción celular, a una disminución

de la proteólisis que las proteínas sufren o una combinación de ambos factores. Teniendo esto en cuenta, se decidió estudiar si el aumento en la acumulación de las proteínas localizadas en el apoplasto se debía a un cambio de las propiedades del mismo. Se determinó que el pH del apoplasto en plantas control no infiltradas era de $5,53 \pm 0,05$, valor esperado según la bibliografía (Sakurai, 1998, Felle, 2001). El pH del apoplasto es un factor dinámico y su cambio puede ser un efecto secundario sin implicaciones funcionales, sin embargo, hay cada vez más evidencias que cambios en el pH apoplástico pueden estar involucrado en procesos de respuesta a estrés tanto biótico como abiótico, el pH del apoplasto se incrementa durante la interacción entre la planta y el patógeno, así como durante respuesta a estrés salino o sequías (Geilfus, 2017, Felle, 2001, Felle y col 2009, Geilfus y col 2017). Es por ello que se decidió estimar el pH del apoplasto de hojas infiltradas con el vector vacío como control de los cambios sufridos por la propia infección de agrobacterium. En estas condiciones, el pH promedio fue de $5,88 \pm 0,27$, estos datos coinciden con los observados al incubar protoplastos con el peptidoglicano proveniente de *A. tumefaciens*, en cuyo caso se observó un ΔpH de aproximadamente 0,4 en el medio (Erbs y col 2008). En cambio, en hojas que expresan LEC2 en aumento de pH fue más marcado, alcanzando un promedio de $7,13 \pm 0,21$. Este aumento de pH podría explicar la estabilización de las proteínas en el apoplasto. Los genes de la red LAFL poseen un rol central en reprogramar la vía de señalización hormonal de la semilla, siendo targets directos de la red genes implicados en la síntesis, metabolismo y vía de señalización del ácido absísico (ABA), ácido giberélico (GA), brasinoesteroides (BR), citoquininas (CK), etileno, auxinas y ácido jasmónico (JA) (Jia y col 2014). En particular, LEC2 regula directamente la vía de señalización de auxinas mediante la activación de los genes YUCCA y IAA, involucrados en la síntesis y señalización de auxinas, respectivamente (Braybrook y col 2006, Wojcikowska y col 2013). A su vez, LEC2 también contribuye en la regulación de las vías de biosíntesis y señalización de ABA, GA y etileno (Jia y col 2014). La red LAFL también participa en la integración entre las distintas hormonas y las señales de desarrollo intrínsecas durante el desarrollo de la semilla y otras etapas de desarrollo (Jia y col 2014). Tanto ABA como las auxinas han sido involucrados en generar cambios en el pH del apoplasto (Geilfus, 2017), por ejemplo, los niveles de ABA incrementan en respuesta a estrés salino, causando una disminución de la actividad de una H^+ -ATPasa de la membrana plasmática

a través de cambios en su estado de fosforilación, como consecuencia, el flujo de protones hacia el apoplasto disminuye, generando alcalinización de este compartimento (Falhof y col 2016, Zhang y col 2016, Bobik y col 2010). En el caso de las auxinas, se ha descrito la relación entre su vía de señalización, el crecimiento ácido, la homeostasis del pH del apoplasto y la expansión celular en tallos de *Arabidopsis* (Majda y Robert, 2018, Geilfus, 2017), sin embargo, estudios realizados en raíces indican que aumentos endógenos o exógenos de la concentración de auxinas inducen alcalinización transitoria de la matrix extracelular, apuntando a una regulación compleja dosis dependiente por parte de las auxinas en la regulación del pH apoplástico, siendo estos cambios bifásicos, debido a que tratamientos por tiempos superiores a 2 hs generan acidificación de este espacio (Barbez y col 2017), mientras que otros datos apuntan a que el tratamiento con auxinas genera alcalinización del apoplasto en la zona de elongación en raíces de *Arabidopsis* (Gjetting y col 2012). Teniendo en cuenta estos datos, la integración de las señales generadas por auxinas y ABA podría explicar en parte los cambios observados en el pH del apoplasto observados en las hojas tratadas con LEC2, siendo importante tener en cuenta que la activación de estas vías y como se integran en la hoja podrían variar respecto de los órganos donde fueron estudiadas.

Teniendo en cuenta que se ha informado que el apoplasto es un compartimento proteolítico y se ha atribuido a proteasas de este compartimento la degradación de proteínas foráneas (Jutras y col 2015b, Robert y col 2016, Benchabane y col 2008b, Jutras y col 2018), se estudió como afecta la expresión de LEC2 la actividad proteolítica total de extractos de plantas de *N. benthamiana*. La actividad proteolítica total de extractos de hojas infiltradas con LEC2 fue un 25% del valor obtenido para hojas sin infiltrar, mientras que las hojas infiltradas con agrobacterias llevando el vector vacío poseían una actividad proteolítica del 50% respecto al control. La actividad de proteasas de la familia A1 (aspartato proteinasa) y C1A (cistein proteinasa), las cuales representan los mayores niveles de actividad proteolítica de los extractos de plantas, generalmente aumentan con la edad de la hoja para extractos totales, sin embargo, la misma actividad en extractos de apoplasto disminuyen con la edad de la hoja (Robert y col 2013b) mostrando una fuerte dependencia entre la edad de la planta y la actividad proteolítica y la falta de concordancia entre los valores de actividad proteolítica total y los de un compartimento específico. A su vez, la agroinfiltración tiene un profundo impacto en el

proteoma y transcriptoma de la plata como se ha demostrado en *N. benthamiana* y en tabaco, en las cuales los transcriptos para numerosas proteasas se encontraban *up*-regulados luego de la agroinfiltración, es por ello que se puede proponer que la proteólisis sufrida por las proteínas heterólogas podría explicarse en parte debido a la respuesta inmune desencadenada durante la agroinfiltración, sin embargo, el entendimiento de la respuesta a la agroinfiltración es limitado (Grosse-Holz y col 2018, Pillay y col 2016) y diversos ensayos han demostrado que algunas proteasas no sufren cambios en su actividad en respuesta a la agroinfiltración (Robert y col 2013b, Pillay y col 2016), mientras que en otras la misma se ve disminuida (Robert y col 2013b). A su vez, se ha demostrado que no sólo la agroinfiltración afecta la actividad proteolítica de los extractos de plantas, sino también la expresión de proteínas heterólogas tiene un fuerte impacto sobre la misma, especialmente en extractos provenientes del apoplasto (Robert y col 2013b). Si bien debido a que en estos estudios se analizó la actividad proteolítica de proteasas específicas, por lo que estos resultados no serían completamente comparables con los obtenidos en el presente trabajo, indican que el perfil de proteasas de extractos totales y derivados del apoplasto se ven afectados por múltiples factores, por lo cual hay que ser muy cuidadoso a la hora de analizar y sacar conclusiones sobre los resultados obtenidos y sería necesario realizar más estudios con la finalidad de determinar si el efecto observado se debe a la sobreexpresión de LEC2 o es causado por otros mecanismos que se están activando durante la agroinfiltración y/o la fase de expresión transitoria. A su vez, también indican que extender los resultados observados al perfil de proteólisis del apoplasto no sería adecuado. A pesar de ello, podemos decir que la actividad proteolítica total de extractos de hojas que expresan LEC2 es significativamente menor que los controles utilizados, y esto podría, en parte, explicar la mayor estabilización observada en las proteínas recombinantes expresadas en esta condición.

Considerando los resultados expuestos, y recordando el diseño experimental planteado al principio de este capítulo, se tienen evidencias indirectas que LEC2 efectivamente generó aumentos en la síntesis de proteínas, activación de la vía secretoria, disminución de la proteólisis y se generaron cambios que podrían corresponder con modificaciones en la señalización hormonal.

En conclusión, se demostró la utilidad del gen LEC2 para aumentar los niveles de expresión de proteínas, tanto sencillas como complejas, direccionadas a diferentes compartimentos subcelulares, observándose aumentos de 2,5 – 4 veces para proteínas retenidas en el ER, de 3 – 7 veces para proteínas vacuolares y de 5 – 8 veces para el caso de proteínas direccionadas al apoplasto. Es remarcable la importancia de las mejoras observadas para el caso de sec-Ab, debido a que los anticuerpos son generalmente direccionados a este compartimento. La estrategia planteada en este capítulo es novedosa, debido a que los trabajos y patentes que reivindican el uso de LEC1 o LEC2 se basaban en el uso de los mismos para inducir embriogénesis somática (Harada y col 2002, Harada y col 2001). Una patente posterior reivindicaba la expresión de factores de transcripción conteniendo el dominio de unión a DNA B3 como método para retrasar la senescencia, reducir la estatura, incrementar el número de tallos o aumentar la biomasa en plantas (Harada y col 2009). Estas son las únicas patentes otorgadas que poseen el gen LEC2 completo en las reivindicaciones. Hay una patente vigente que protege la expresión estable de numerosos factores de transcripción de plantas para mejorar características agronómicas tales como demora en la floración, y tolerancia a stress (Ratcliffe y col 2007). Existiendo también una patente que protege el la utilización genes AFL como por ejemplos los homólogos de remolacha (*Beta vulgaris*) BvLec1, BvLec2 /Fusca3, BvWri1, BvTag1, AtLec1, AtLec2, AtWri1, para incrementar la síntesis de ácidos grasos en remolacha, tabaco y otras dicotiledóneas (Smigocki y Bruccoleri, 2017), así como trabajos que proponen el uso de LEC2 para producir biocombustibles (Andrianov y col 2010, Grimberg y col 2015). La utilización de los genes AFL para incrementar la producción de proteínas no está incluida en las reivindicaciones de ninguna patente ni ha sido reportado en publicaciones científicas. Los mismo ocurre con algunas patentes que protegen genes con un alto grado de similitud secuencial con dominio B3 de las proteínas AFL que también apuntan a características agronómicas como tolerancia stress o procesos para incrementar la producción de lípidos (Abad Mark y col 2014, Alexandrov y col 2007, Graham Ian y Penfield, 2007, Gutterson y col 2008, Gutterson y col 2009, Vanhercke y col 2014). Ante los resultados obtenidos con LEC2, y considerando que LEC2 integra la red conocida como AFL (Devic y Roscoe, 2016) se plantea que los otros genes AFL podrían tener efectos similares. Además, los efectos de estos genes podrían ser aditivos y/o sinérgicos. A su vez, resulta interesante considerar

el impacto que tendría esta tecnología si se pudiera extender a los sistemas de expresión estable. Para ello habría que tener en cuenta cual sería el promotor adecuado para ser utilizado en los sistemas de expresión estable sin afectar la viabilidad, crecimiento y otras características fisiológicas que son necesarias para obtener buenos niveles de proteína recombinante. Además de presentar una fuerte herramienta biotecnológica para la producción de proteínas recombinantes, la capacidad de LEC2 de reprogramar la naturaleza de la célula vegetal permitiría su uso para realizar estudios básicos sobre el funcionamiento de diversas vías de transporte y señalización celular.

Conclusiones

Conclusiones

En este trabajo se propuso, por un lado, aportar información sobre el funcionamiento de la vía transporte de proteínas cargo hacia vacuolas en plantas y evaluar las posibles aplicaciones biotecnológicas de la estrategia de direccionamiento hacia este compartimento y, por otro lado, considerando que la capacidad de síntesis y plegado de todos los sistemas de expresión está limitada, se decidió evaluar el efecto de la expresión de LEC2, un regulador clave en el desarrollo de la semilla, en los rendimientos y rutas de transporte seguidos por las proteínas direccionadas a la vía secretoria.

En relación al primer objetivo, se demostró que la deposición de anticuerpos en el interior celular, ya sea el ER o la vacuola produce aumentos en los rendimientos de producción al compararlo con la acumulación en el apoplasto. Siendo importante remarcar, que los anticuerpos producidos en los diferentes compartimentos fueron capaces de ensamblarse en tetrámeros funcionalmente activos y alcanzaron de manera correcta el compartimento subcelular al que fueron direccionados. A su vez, los análisis de glicosilación indicaron que los anticuerpos alcanzan la vacuola siguiendo dos rutas distintas: una Golgi dependiente, y otra que es directa desde el ER, pudiendo esta diferencia en las vías seguidas ser explicadas a través de la saturación de la maquinaria de transporte.

En relación al segundo objetivo, se demostró que LEC2 es capaz de alcanzar de manera correcta el núcleo de células de *N. benthamiana*. La expresión ectópica de LEC2 genera aumentos en los niveles de acumulación de proteínas, tanto sencillas como complejas, retenidas en el ER y direccionadas a apoplasto y vacuola. En este último caso, además, se observa una redirección de la proteína la cual se localiza en el apoplasto donde se acumula de manera estable. Esta secreción se ve acompañada con un aumento en el pH apoplástico y una disminución de la actividad proteolítica total de los extractos obtenidos. Los resultados obtenidos con LEC2 apuntan a un control fino y la activación de vías de transporte diferenciales hacia vacuolas, debido a que, si bien las proteínas conteniendo señales vacuolares resultaron secretadas, en el caso de ER-Ab se observó que el mismo localizó en el ER, pero a su vez fue transportado a la vacuola central y

parcialmente secretado. Por lo expuesto, LEC2 puede aplicarse como una estrategia para mejorar los niveles de acumulación de proteínas recombinantes direccionadas e la vía secretoria y también constituye una herramienta útil para realizar estudios básicos debido a su capacidad de reprogramar la naturaleza de la célula vegetal.

Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Material biológico

1.1.1. Cepas bacterianas

-Escherichia coli

DH5 α : F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ -. Utilizada en clonados convencionales.

TOP10 (OneShot[®] TOP10, Invitrogen Argentina, SA): F- mcrA Δ (mrrhsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ -. Utilizada en clonados que requieren alta eficiencia de transformación.

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

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

-Agrobacterium tumefaciens

GV3101: *Agrobacterium* que contiene integrado en su cromosoma secuencias derivadas del plásmido Ti desarmado pTiC58 y un gen de resistencia a rifampicina, además del plásmido helper pMP90 (pTiC58 Δ T-DNA) que contiene un gen de resistencia a gentamicina y lleva los genes necesarios para la transferencia del T-DNA.

1.1.2. Plantas

Nicotiana benthamiana jóvenes (3-4 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).

Arabidopsis thaliana línea transgénica Apo-pHusion: Línea con expresión estable de la proteína quimérica apo-mRFP1-EGFP (Red Fluorescent Protein- Green Fluorescent

Protein) direccionada al apoplasto, donde funciona como sensor de pH (Gjetting y col 2012). Previo a la siembra las semillas se estratificaron embebidas en agua destilada (dH₂O) durante 2-3 días a 4 °C en oscuridad. Luego fueron cultivadas con sustrato profesional multipropósito GrowMix (Terrafertil S.A., Argentina) y se fertilizaron con Sampi (importado por S. Ando y Cía. S.A., Argentina -origen: Japón). Las plantas fueron crecidas en cámara de cultivo de 22°C con fotoperiodo de 10 hs de luz, 14 hs de oscuridad para favorecer el desarrollo foliar.

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 Super Optimal broth with Catabolite represión (SOC)*: Triptona 20g/l, Extracto de levadura 10g/l, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM, Glucosa 20mM.
- *Medio Yeast Extract-Beef extract (YEB)*: Triptona 10 g/L; Extracto de levadura 5g/L; Extracto de carne 5g/L; NaCl 0,09 M; Glucosa 5,5.10⁻³M. Para obtener medios de cultivo sólidos se adicionó 18 g/L de agar-agar.
- *Medio PSI*: Triptona 20g/L, Extracto de levadura 5g/L, MgSO₄ 5 g/L, pH=7,60.
- *Medio de inducción*: 0,1% (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄ 0,45%, K₂HPO₄ 1%, Sacarosa 0,2%, Citrato de Sodio 0,05%, 0,5% Glicerol, MgSO₄ 1 mM, pH 5,7.
- *Medio de infiltración (MI)*: MgCl₂ 10mM, 10 mM ácido morfolinoetansulfónico (MES) pH 5.7.

1.2.2. Soluciones

- *Phosphate buffered saline (PBS)*: 10mM Na₃PO₄, 150 mM NaCl, 2.7mM KCl, pH=7.4.
- *Buffer Tris-acetato-EDTA (TAE) 50X*: 2 M Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0.
- *Tris-buffered saline (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 _mercaptoetanol.
- *Buffer de extracción*: Tris 45 mM, NaCl 15 M, EDTA 1 mM, Ascórbico 40 mM pH 7,4. El ácido ascórbico se agrega en el momento de uso y se ajusta pH con NaOH 1 M.
- *Buffer EB para extracción de microsomas*: Tris-HCl 100 mM, sacarosa 25% [p/p], glicerol 5% [v/v], EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, KCl 5 mM y DTT 1 mM, pH 7.5
- *Buffer lavado extracción de microsomas*: Tris-HCl 20 mM pH 7.5 EDTA, 5 mM y EGTA 5mM
- *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.

1.3. Soluciones de antibióticos

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

1.4. Reactivos

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

- Merck (Darmstadt, Alemania).
- Sigma (St. Louis, EE.UU.).
- Fluka (Buchs, Suiza).

- Carlo Erba (Milán, Italia).
- Mallinkrodt (New York, EE.UU.).
- QIAGEN Inc. (Valencia, EE.UU.)-

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).

1.5. Vectores plasmídicos

1.5.1. Plásmidos comerciales

pENTR™/D-TOPO® 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.

1.5.2. Plásmidos disponibles en nuestro laboratorio

Utilizados para agroinfiltración:

- pGA482 HC 14D9 (Petruccelli y col 2006a) denominado sec-HC
- pGA482 HC 14D9-KDEL (Petruccelli y col 2006a) denominado ER-HC
- pGA482 LC 14D9 (Petruccelli y col 2006a) denominado sec-LC
- pGWB2 LC 14D9-mCherry (González, 2010) denominado LC-RFP
- pGWB2 HC 14D9-mCherry (González, 2010) denominado HC-RFP
- pGWB2 HC 14D9-KISIA (Lareu y col 2013) denominado vac1-HC
- pGWB2 HC 14D9-NIFRGF (Lareu y col 2013) denominado vac2-HC
- pGWB2 HC-RFP-KISIA (Lareu y col 2013) denominado vac1-HC-RFP
- pGWB2 GFP-KISIA denominado vac1-GFP

- pGWB2 GFP-NIFRGF denominado vac2-GFP

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

1.5.3. Plásmidos cedidos por otros laboratorios

- pBin19-TBSV (Voinnet y col 2003).
- pBIN61-GFP-HDEL (Brandizzi y col 2003).
- pBIN20-ER-Cherry (Nelson y col 2007).
- pVKH18-EN6-ST-GFP (Brandizzi y col 2002).
- RFP-AFVY (Hunter y col 2007).
- pGWB2 (Nakagawa y col 2007).
- pEAQ-HT-DEST1 (Sainsbury y col 2009).
- pMDC43 (Curtis y Grossniklaus, 2003).

1.5.4. Plásmidos adquiridos comercialmente del *Arabidopsis Stock Center*

- TOPO-U15-D01 (AT1G28300, LEC2)

1.6. Enzimas y kits enzimáticos

Enzimas de restricción: KpnI, HindIII, MluI, EcoRV, NdeI, NheI, SacI y PflMI. Las enzimas fueron comercialmente adquiridas junto con sus correspondientes buffers de reacción, a los proveedores siguientes, según se indica:

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 informáticas

ImageJ (<http://imagej.nih.gov/>) y Adobe PhotoShop CS5: fueron utilizados para editar digitalmente las fotos e imágenes del presente trabajo y para la cuantificación de

bandas de los inmunoensayos y de geles teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 por densitometría.

Clone Manager 7, versión 7.11 (Sci Ed Central): utilizado para simular reacciones Gateway, que permitieron verificar la continuidad de los marcos de lectura el clonado de las construcciones obtenidas. 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.

Prims 6 (GraphPad Software, GraphPad Inc., La Jolla, CA) e Infostat (versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>): empleados para realizar los análisis estadísticos.

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

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

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

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

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

1.8. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios comerciales utilizados fueron anti-GFP de ratón (Sigma-Aldrich, product # G1546), anti-RFP de conejo (Thermo Scientific Pierce, product # R10367) y anticuerpos de conejo específicos de β 1,2-Xilosa, α 1,3-Fucosa y Lewis A. 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) y estreptavidina conjugada con

HRP (Thermo Scientific Pierce product # 21130). Las concentraciones utilizadas se detallan en la Tabla M1.

Tabla M1. Diluciones utilizadas de los diferentes anticuerpos para ensayos de inmunoblot

ANTICUERPO	DILUCION	EN
Anti-GFP mouse	1:1000	leche 1%p/v en <i>buffer</i> PBS
Anti-BiP rabbit	1:4000	leche 1%p/v en <i>buffer</i> PBS
Anti-GUS rabbit	1:1000	leche 1%p/v en <i>buffer</i> PBS
Anti-RFP rabbit	1:1000	leche 1%p/v en <i>buffer</i> PBS
Anti-His mouse	1:1000	leche 1%p/v en <i>buffer</i> PBS
Anti-mouse como 1° atc para 14D9	1:3000	leche 1%p/v en <i>buffer</i> PBS
Anti- β 1,2-Xilosa	1:1000	Gelatina 1% en <i>buffer</i> PBS
Anti- α 1,3-Fucosa	1:1000	Gelatina 1% en <i>buffer</i> PBS
Anti Lewis a	1:1000	Gelatina 1% en <i>buffer</i> PBS
Anti-mouse como 2°atc	1:20.000	leche 1%p/v en <i>buffer</i> PBS
Anti-rabbit como 2°atc	1:20.000	leche 1%p/v en <i>buffer</i> PBS o en gelatina 1%p/v en <i>buffer</i> PBS para análisis de glicanos.
HRP-Streptavidina	1:20.000	leche 1%p/v en <i>buffer</i> PBS
BLOQUEO		leche 5%p/v en <i>buffer</i> PBS gelatina 3% p/v en <i>buffer</i> PBS para el análisis de glicanos

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 Wizard Plus SV Minipreps (Promega Corporation, Madison, EEUU), 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 μ l de la preparación del plásmido, en un volumen final de 30 μ l con agua bidestilada estéril. Para las demás enzimas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l, utilizando 10 U de cada enzima en el *buffer* recomendado por el fabricante y 5 μ l de la preparación de plásmido. Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37°C de 1 a 3 horas, según el caso. En caso de digestiones dobles se utilizó un *buffer* que fuera compatible con ambas enzimas, si era posible o se procedió realizando digestiones secuenciales.

2.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Las muestras de DNA, tanto plasmídico como productos de digestión enzimática, 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 y utilizando 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. 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 pEAQ-HT-DEST1.

2.6. Preparación de células competentes químicas de *E. coli* DH5-α y TOP10

Las células de *E. coli* competentes químicas se prepararon por el método de cloruro de rubidio. Se partió de un stock de células conservado en glicerol a -80°C, se realizó un cultivo en medio LB con el antibiótico correspondiente y se dejó crecer toda la noche en agitación (200rpm) a 37°C. Al día siguiente se tomó una alícuota de dicho cultivo para inocular un volumen de 500ml de medio PSI con el antibiótico correspondiente. Se incubó este cultivo en agitación a 37°C hasta alcanzar una DO600 de aproximadamente 0,5. Se incubó el cultivo 15 minutos a 4°C y luego se centrifugó 5

minutos a 5000 rpm a 4°C (Ultracentrífuga Beckman Coulter Avanti J-25). Luego el precipitado se resuspendió en 200 ml de *buffer* TBF1. Se repitió la incubación a 4°C y la centrifugación. Se resuspendió el precipitado en 20ml de *buffer* TBFII e incubó 15 minutos a 4°C. Finalmente se fraccionó de a 100µl en tubos estériles y congeló en nitrógeno líquido para luego almacenar a -80°C.

2.7. 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.

2.8. Preparación de células electrocompetentes de *A. tumefaciens* GV3101

La obtención de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 electrocompetentes se realizó de la siguiente manera: se inoculo 5 ml de agrobacterias provenientes de un cultivo saturado en 500 ml de medio YEB conteniendo gentamicina 50 µg/ml y se dejó crecer hasta una densidad óptica (DO) de 600 nm igual a 0,5 - 0,7. Las bacterias se centrifugaron a 4000 rpm (2455g, rotor JA-14 Beckman) por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en glicerol 10 % estéril a 4°C en lavados sucesivos de 1; 0,5; 0,2 y 0,2 volúmenes del cultivo original. Finalmente, las bacterias fueron resuspendidas en 0,01 Vol. y se alicuotaron en tubos de 1,5 ml de a 100 ul. Por último. fueron conservadas a -80°C hasta su uso.

2.9. Transformación de células electrocompetentes de *A. tumefaciens* GV3101

El stock de células electrocompetentes se encuentra conservado a -80°C . Tanto las células como las cubetas estériles de 2mm (Bio-Rad) se colocan en hielo 10 minutos antes de realizar la transformación. Una vez descongeladas, se ponen en contacto $100\mu\text{l}$ de células con $0,5\text{-}5\mu\text{l}$ 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: $25\ \mu\text{F}$
- Voltaje: $2.5\ \text{KV}$
- Resistencia: $200\ \Omega$

Luego de electroporar se deja la mezcla en hielo 1 minuto para que se reconstituya la membrana plasmática y se adiciona medio SOC (pre-calentado a 28°C). La mezcla se transfiere a un tubo estéril y se incuba toda la noche en agitación ($200\ \text{rpm}$) a 28°C . Posteriormente, se concentra por centrifugación el cultivo y se siembra con varilla de vidrio en placas YEB 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.

2.10. Agroinfiltración de plantas de *Nicotiana benthamiana*

Los ensayos de agroinfiltración se efectuaron de acuerdo al método descrito por (Batoko y col 2000). Para ello se cultivó un clon de *A. tumefaciens*, conteniendo el plásmido binario correspondiente, en medio YEB líquido con los antibióticos adecuados a $28\ ^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche, en oscuridad y agitación ($200\ \text{rpm}$). Luego se indujo el cultivo por el agregado de acetosiringona (concentración final $200\ \text{mM}$) y se lo incubó a 28°C durante 2-4 hs. El cultivo se diluyó hasta obtener la DO_{600} deseada para cada construcción según la Tabla M2. Se prepararon las suspensiones bacterianas correspondientes por medio de centrifugación y resuspensión de las bacterias en agua

destilada. A continuación, se infiltró la superficie abaxial de las hojas de *N. benthamiana* de 4 semanas de edad utilizando una jeringa de 1 ml sin aguja. Las plantas infiltradas se mantuvieron en las mismas condiciones utilizadas para su crecimiento.

Tabla M2. DO₆₀₀ utilizada para las diferentes construcciones empleadas

Construcción génica	DO ₆₀₀ utilizada
P19	0,1
ER-GFP	0,1
sec-HC	0,4
ER-HC	0,4
Sec-LC	0,2
LC-RFP	0,2
HC-RFP	0,4
Vac1-HC	0,4
Vac2-HC	0,4
Vac1-HC-RFP	0,4
LEC2	0,4
GFP-LEC2	0,4
Vac1-GFP	0,4
Vac2-GFP	0,4
RFP-AFVY	0,4
GA-GFP	0,2
PVC-GFP	0,2

2.11. Extracción de proteínas en hojas de plantas

La toma de muestra a pequeña escala se realizó colectando 6 discos de hoja de 5 plantas diferentes agroinfiltradas con la construcción de interés, obteniendo así 30 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 procedió a moler las muestras con un pilón adecuado, utilizando un tubo de 1,5ml como mortero, manteniéndolas siempre en hielo. 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 µl por disco) y 25 µg 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 Miracloth. 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 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 μ 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.

2.12. Extracción y purificación de anticuerpos

Las hojas fueron cosechadas 5 días después de las agroinfiltraciones, pesadas en balanza analítica y almacenadas a -80°C hasta el momento de realizar la extracción. Para la extracción primero fueron molidas en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido, realizándose la molienda hasta obtener un polvo fino. Este polvo fue transferido a un vaso de precipitado adicionándole un volumen de *buffer* de extracción igual a la cantidad de hojas y 25 μ g de PVPP (*polivinil polipirrolidona*). Esta suspensión se incubó con agitación por 15 minutos a 4°C para facilitar la disolución del anticuerpo. La mezcla se filtró luego con una lámina de Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA) y el filtrado se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C para eliminar los restos de tejido vegetal. Posteriormente el sobrenadante se filtró nuevamente en este caso a través de un filtro de tamaño de poro 45 μ m. Al filtrado se le adicionó 20 μ L de resina proteína G-Sepharosa 4 Fast Flow (GE 17-0818-01) previamente equilibrada (se equilibra directamente en la columna, pasando 3 volúmenes de PBS 1X). Para facilitar la unión del anticuerpo a la proteína G, los extractos fueron incubados en agitador circular (Decalab, Argentina) durante 1,5 horas a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo el extracto fue pasado a través de una columna de cromatografía Micro Bio-Spin (Bio Rad Life Science #7326204) quedando la Sepharosa Proteína G retenida en la placa de vidrio poroso de la columna. Este procedimiento se realizó a 4°C. El extracto se dejó pasar por gravedad y en aquellos casos en que el flujo era lento se realizaron centrifugaciones a una velocidad de 2000 rpm a 4°C. Una vez que se completó el pasaje de todo el extracto, el tubo donde se incubo el extracto fue lavado con PBS para recuperar la mayor parte de la Sepharosa- Proteína G. Finalmente la resina retenida en las columnas micro Bio Spin fue lavada con 3 volúmenes de PBS 1X para eliminar la proteína no unida. Luego se adicionó 40 μ L de *buffer* de muestra de electroforesis, los tubos se sellaron con cinta adhesiva para evitar la evaporación y se hirvió a 95°C durante 5 minutos para separar el anticuerpo de la proteína G y se centrifugó a 2000 rpm.

2.13. Cuantificación de proteínas

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

2.14. Medida de actividad proteolítica por el método de la azocaseína

Para la cuantificación de la actividad proteolítica total se realizaron extractos de plantas WT y plantas infiltradas con *Agrobacterium tumefaciens* portando un vector vacío o LEC2 a los 5 días post infiltración (dpi). 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 en *buffer* fosfato pH 5,5 y cada muestra fue analizada por duplicado. A 100 µl de extracto se le adicionaron 100 µl de azocaseína 0,5% (p/v) en *buffer* fosfato pH 5,5. La mezcla de reacción se incubó durante 3 hs a 37°C y fue detenida con el agregado de 100 µl de TCA 10% frío. Se incubaron las mezclas con TCA durante 15 minutos a 4°C para precipitar la azocaseína que no fue degradada y posteriormente se centrifugaron a 10000 xg durante 10 minutos a 4°C. A 250 µL del sobrenadante se le adicionaron 750 µL de NaOH 1N y se midió la absorbancia a 440 nm.

La actividad se expresó como actividad relativa respecto al extracto de hojas WT.

2.15. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Las electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDSPAGE) se efectuaron utilizando el equipo Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la preparación de los geles de poliacrilamida se siguió el siguiente protocolo: Se preparó el gel de separación según la composición indicada en la tabla M3, se agregó el TEMED y el persulfato de amonio, se mezcló suavemente para evitar la incorporación de aire y se colocó entre los vidrios con la ayuda de una pipeta automática. Una vez cargado $\frac{3}{4}$ de volumen total se agregó

un volumen pequeño de etanol 70% v/v para evitar que el oxígeno del aire inhiba la polimerización de la superficie. Se esperaron aproximadamente 30 minutos para dar lugar a la polimerización y luego se preparó el gel de apilamiento de la misma manera.

Tabla M3. Composición de los geles de poliacrilamida.

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

*Los volúmenes están expresados en ml.

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

2.16. Inmunoensayo

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

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

Revelado: Las membranas se bloquearon incubándolas 1 hora a 37°C en leche descremada en polvo 5%p/v en PBS o en gelatina 5%p/v en caso del análisis de glicanos.

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

2.17. 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 60°C durante 30 minutos. Luego se lavó 6 veces con PBS durante 5 minutos. A continuación, se bloqueó la membrana nuevamente con leche descremada en polvo 5% p/v en PBS y se desarrolló el inmunoblot normalmente.

2.18. 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.

2.19. Análisis por MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry)

La banda correspondiente a la cadena pesada (aproximadamente 3 ug) fue separada del SDS-PAGE, cortada en pequeñas piezas, lavada dos veces (15 minutos cada una) con 50 µl de acetonitrilo 50% (v/v) para remover SDS residual y el colorante Coomassie. Luego se trata unos segundos con 50 µl acetonitrilo 100%, seguido de una incubación de 5 minutos con 30 µl NH₄HCO₃ 0.1 M fresco y 15 minutos con 50 µl

acetonitrilo 100%. Luego se seca 15-20 min en Speed Vac sin calor. Posteriormente se realiza la carbamidametilación. Para ello se reduce con 50 μ l DTT (ditiotreitól) 10 mM disuelto en NH_4HCO_3 0.1 M por 45 min a 56 °C. Se descarta el líquido y se alquila con 50 μ l iodoacetamida 55mM en NH_4HCO_3 0.1 M durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se lava nuevamente las piezas de gel con 50 μ l acetonitrilo 50% (dos lavados de 15 minutos) y un lavado de unos segundos con 50 μ l acetonitrilo 100% seguido de una incubación de 5 minutos en 30 μ l NH_4HCO_3 0.1 M fresco y 15 minutos en 30 μ l acetonitrilo 100%. Finalmente se seca 15-20 min en speed vac. El proceso se continúa con una digestión triptica empleando 10 μ l de tripsina-bovina 50 ng/ μ l en HCl 1 M y 10-20 μ l NH_4HCO_3 25mM. Las piezas del gel se incuban en esta solución 37°C toda la noche. Finalmente se extraen los péptidos con 30 μ l NH_4HCO_3 25 mM pH 8.0 durante 15 minutos, luego se agrega 30 μ l acetonitrilo 100% y se continúa la extracción por 15 minutos. El líquido conteniendo los péptidos se pasa a un eppendorf. Las piezas de gel se extraen nuevamente con 30 μ l ácido fórmico 5% durante 15 minutos, repitiéndose esta última extracción una vez más. Estos extractos se mezclan con el primero, y los péptidos se secan toda la noche en speed vac. Para el análisis por MALDI-TOF-MS los péptidos se disuelven en 20 μ l de ácido fórmico 5% y 5 μ l solución de matriz (1% ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico en acetonitrilo 70% en agua). Alícuotas de 1 μ l se aplican en el plato de muestra plano, se secan inmediatamente con vacío y el espectro MALDI-TOF-MS se adquiere en un Espectrómetro de Masa DYNAMO linear TOF (Thermo BioAnalysis, Hemel Hempstead, U.K.) como se describe en Wilson y col 2001.

Los análisis por MALDI-TOF fueron realizados en Departamento de Genética Aplicada y Biología Celular, BOKU, Viena, Austria en el marco de un proyecto de colaboración con la Dra. Herta Steinkellner.

2.20. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

2.20.1. ELISA tipo sándwich

Para cuantificación de los niveles de expresión de las diferentes variantes del anticuerpo las muestras de hoja de *N. benthamiana* fueron colectadas a 5 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 una dilución 1:5000 de anticuerpo anti-ratón específico contra la cadena liviana (LC) producido en cabra en PBS a 4°C durante toda la noche. Los sitios de unión no específicos fueron bloqueados con leche descremada 3% p/v en PBS durante 1 hora a 37°C. Luego de tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS la placa fue incubada con 100 µg de proteínas solubles totales de hoja (TSP) durante toda la noche a 4°C. Las placas fueron lavadas nuevamente con PBS e incubadas con una dilución 1:3000 de anticuerpo anti-ratón conjugado a biotina específico contra la cadena pesada (HC) producido en cabra en leche 1% p/v en PBS durante toda la noche a 4°C. Posteriormente las placas se lavaron e incubaron durante 1 hora a 37°C con una dilución 1:20000 de estreptavidina conjugada a HRP. 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. Una inmunoglobulina IgG comercial purificada fue utilizada para realizar la curva de calibración.

2.20.2. ELISA indirecto

Para analizar la capacidad de los anticuerpos de interactuar con su antígeno, se llevó a cabo un ELISA indirecto. El mAb14D9 es un anticuerpo catálítico que reconoce el hapteno enol eter 14D9 (Reymond et al., 1993). Las placas fueron sensibilizadas con el hapteno 14D9 fusionado a BSA (1 µg/ml), el cual fue provisto por Richard Lerner, The Scripps Research Institute, La Jolla CA), por absorción pasiva durante 16 horas a 4°C. El bloqueo se realizó con leche descremada 3% p/v en PBS durante 1 hora a 37°C y posteriormente se incubaron durante toda la noche con 100 µg de TSP a 4°C. Finalmente, se realizaron incubaciones con anticuerpo anti-ratón IgG conjugado a biotina, estreptavidina conjugada a HRP (1:20000) y TMB peroxidasa como se describió en la sección anterior.

2.21. Aislamiento de membranas microsomales

El aislamiento de la fracción de membranas microsomales fue mayormente realizado como se describe en (Abas y Luschnig, 2010). Todos los pasos fueron realizados en hielo y todas las centrifugaciones a 4°C. Muestras de hoja (50 mg para ER-Ab y Vac-

Abs y 200 mg para sec-Ab) fueron molidas en hielo y luego se adiciono *buffer* EB (Tris–HCl 100 mM, sacarosa 25% [p/p], glicerol 5% [v/v], EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, KCl 5 mM y DTT 1 mM, pH 7.5) en relación 1 µl EB/ mg de material, volumen mínimo utilizado 100 µl. Los extractos se centrifugaron a 600 xg durante 3 minutos y se conservó el sobrenadante. El pellet obtenido fue re-extraído usando la mitad del volumen original y centrifugado a 600 xg durante 3 minutos y el sobrenadante se adicionó al obtenido en la centrifugación previa. Las muestras fueron diluidas para obtener una concentración de sacarosa final de 12% p/p, divididas en alícuotas de 200 µl en tubos de 1,5 ml y centrifugadas a 21000 xg durante 2 horas. El sobrenadante se conserve como la fracción soluble (FS) y los pellets microsomaes (PM) fueron lavados con 150 µl de *buffer* de lavado (Tris–HCl [pH 7.5]20 mM, EDTA 5 mM y EGTA 5 mM). Las muestras fueron centrifugadas a 21000 xg durante 45 minutos, el sobrenadante es descartado y el PM fue resuspendido en 100 µl de *buffer* muestra de SDS-PAGE y hervidos durante 5 minutos. Las fracciones solubles y pellets microsomaes fueron conservados a -20°C.

2.22. Agroinfiltración de hojas de *Arabidopsis thaliana*

Para infiltrar hojas de *A. thaliana* se procedió según el protocolo de (Mangano y col 2014). La agrobacteria que portaba el vector binario con la construcción deseada se creció toda la noche, a 28°C en agitación y oscuridad. Este cultivo fue diluido en medio YEB con los antibióticos correspondientes a acetosiringona 100 µM a una DO₆₀₀ de 0,3 y se dejó crecer en las mismas condiciones previas hasta alcanzar una DO de 0,6. Una vez alcanzada esta condición se centrifugo el cultivo a 5000 x g durante 5 minutos, el pellet obtenido fue resuspendido en medio de infiltración adicionado con los antibióticos correspondientes y acetosiringona 200 µM y se incubo a 30°C con agitación durante 3-4 hs. Finalmente se midió la DO₆₀₀, se diluyó el cultivo hasta obtener la DO deseada y se prepararon las suspensiones de bacterias por centrifugación y resuspención en medio de infiltración. La infiltración se realizó utilizando jeringas de 1 ml sin aguja en la cara abaxial de la hoja.

2.23. Obtención y análisis de fluido apoplástico (FA) de hojas

La extracción de FA de hojas se realizó empleando la técnica de infiltración en vacío seguida de centrifugación en frío según (Lohaus y col 2001), Brevemente,

mediante esta técnica las hojas se infiltran con una solución de infiltración (ScIn), que puede ser agua bidestilada (ddH₂O) o un determinado *buffer*, y luego se someten a una centrifugación a bajas revoluciones, que permite extraer Fluido de lavado Apoplástico (FLA), que es el FA más la ScIn.

Para esto las hojas se cortaron de la planta a la mitad del pecíolo e inmediatamente se lavaron con ddH₂O. Para la infiltración se colocaron de a 4-6 hojas en una jeringa de plástico de 60 ml y se cubrieron con ScIn (en este trabajo ddH₂O fría) hasta la marca de 40 ml. Luego se colocó un tapón en el orificio donde se insertaría la aguja y se aplicó vacío tirando del émbolo hasta la marca de 60 ml durante 30 segundos, luego se retiró gradualmente el vacío soltando muy suavemente el émbolo. Los pulsos de vacío se repitieron 5 veces a fin de asegurar la infiltración total de las hojas (hecho que puede visualizarse claramente). Posteriormente, las superficies de las hojas infiltradas se secaron muy bien con papel "tissue" y se colocaron, nuevamente en grupos de 3-4 hojas, en el interior de tubos de centrífuga de 50 ml, con los pecíolos hacia arriba, y adheridos a la boca del tubo con una cinta adhesiva. Para el análisis de metabolitos y proteínas, en cada tubo se agregó 5 µl de 300 mM de PMSF (inhibidor de proteasas serínicas), para realizar medidas de potencial soluto, no se agregó PMSF. Luego se centrifugaron a 4 °C a 500-600 xg durante 40 min. El FLA se colectó del fondo de cada tubo y se traspasó a tubos de 1,5 ml para su almacenamiento a -80 °C hasta ser analizados.

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 Materiales y Métodos 102 (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. Se utilizaron las siguientes condiciones de excitación/emisión: fluorescencia de la clorofila 633/670-730 nm, EGFP 488/524–550 nm, mRFP1 543/566–634 nm. Las imágenes fueron adquiridas con el software LAS AF versión 2.2.1 y se procesaron con el software ImageJ.

2.25. Determinación del pH apoplástico foliar

Se utilizaron plantas de Arabidopsis Apo-pHusion que expresan en el apoplasto el sensor de pH apo-mRFP1–EGFP (Gjetting y col 2012). EGFP es muy sensible a cambios en el pH, la mayor señal de EGFP se da a pH 7-8 y a medida que disminuye el pH la fluorescencia de EGFP se va debilitando, hasta apagarse totalmente a pH < 5 (pKa = 6,15). Por el contrario, mRFP1 es prácticamente insensible a cambios en el pH dentro del rango de pH fisiológico (pKa = 4,5). Con valores de pKa de los dos fluoróforos en el intervalo ácido, este sensor es adecuado para mediciones de pH en el apoplasto de tejidos vegetales (Gjetting y col 2012).

2.25.1 Determinación del pH del apoplasto de hojas *in vivo* por microscopia de fluorescencia

El pH se calculó por la relación de fluorescencia entre EGFP y mRFP1 en el apoplasto de la epidermis de hojas registrada *in vivo* con un microscopio confocal (los detalles del microscopio, y seteos utilizados se describen a continuación). Luego de la captura de imágenes, con el software ImageJ se calculó para cada región de interés (ROI) la relación de intensidades de pixeles promedio EGFP/mRFP1. Para calcular el pH de cada ROI se extrapoló el valor de la relación de intensidades EGFP/mRFP1 del ROI sobre la gráfica de una curva de calibración del sensor.

2.25.2 Calibración *in vitro* del sensor

La curva se generó utilizando FLA extraído de plantas apo-mRFP1–EGFP (la extracción de FLA de hojas de Arabidopsis se describió en el punto 4.1). El FLA se incubó con *buffers* de distintos pH (ver Tabla M4 con la composición de los *buffers*) y se analizó por microscopía confocal. Luego de la captura de imágenes, con el software ImageJ se calculó la relación de la intensidad de la señal de fluorescencia EGFP/mRFP1 para cada

valor de pH, y con el software GraphPad Prism se realizó un ajuste no lineal de la relación EGFP/mRFP1 vs pH y se generó una curva de calibración sigmoide.

Tabla M4. Buffers utilizados para construir la curva de calibración del sensor de pH

pH	Buffer
5,0	MES 300 mM
5,5	MES 300 mM
5,7	MES 300 mM
6,0	MES 300 mM
6,3	MES 300 mM
6,5	MES 300 mM
7,0	Tris HCl 300 mM
7,5	Tris HCl 300 mM
8,0	Tris HCl 300 mM

2.25.3 Análisis de Imágenes. Relación de fluorescencia EGFP/mRFP1

Con el software ImageJ, se generaron imágenes de relación de fluorescencia EGFP/mRFP1 mediante la superposición de imágenes confocales correspondientes a los canales EGFP y mRFP. Para la presentación visual de las imágenes de relación, a partir de la calibración *in vitro* del sensor se diseñó y ajustó una tabla de pseudocolor que abarcó el rango dinámico del sensor.

2.26. Análisis estadístico

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

Bibliografía

- ABAD MARK, S., FERNANDES, M. & GOLDMAN BARRY, S. 2014. *Transgenic Plants With Enhanced Agronomic Traits*. US patent application US 201313998684 A. 2014/07/10.
- ABAS, L. & LUSCHNIG, C. 2010. Maximum yields of microsomal-type membranes from small amounts of plant material without requiring ultracentrifugation. *Anal Biochem*, 401, 217-27.
- AHMED, S. U., ROJO, E., KOVALEVA, V., VENKATARAMAN, S., DOMBROWSKI, J. E., MATSUOKA, K. & RAIKHEL, N. V. 2000. The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH₂-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Biol*, 149, 1335-44.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J. & AL., E. 2002. Transport from the ER through the Golgi Apparatus. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York Garland Science.
- ALEXANDROV, N., BROVER, V., MASCIA, P., FLEDMANN KENNETH, A., CHRISTENSEN, C. & NADZAN, G. 2007. *Nucleotide Sequences And Corresponding Polypeptides Conferring Modulated Plant Growth Rate And Biomass In Plants*. WO patent application US 2005/0047423 W. 2007/10/18.
- ANDRIANOV, V., BORISJUK, N., POGREBNYAK, N., BRINKER, A., DIXON, J., SPITSIN, S., FLYNN, J., MATYSZCZUK, P., ANDRYSZAK, K., LAURELLI, M., GOLOVKIN, M. & KOPROWSKI, H. 2010. Tobacco as a production platform for biofuel: overexpression of *Arabidopsis* DGAT and LEC2 genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass. *Plant Biotechnol J*, 8, 277-87.
- ANGELES-NUNEZ, J. G. & TIESSEN, A. 2011. Mutation of the transcription factor LEAFY COTYLEDON 2 alters the chemical composition of *Arabidopsis* seeds, decreasing oil and protein content, while maintaining high levels of starch and sucrose in mature seeds. *J Plant Physiol*, 168, 1891-900.
- ARZOLA, L., CHEN, J., RATTANAPORN, K., MACLEAN, J. M. & MCDONALD, K. A. 2011. Transient co-expression of post-transcriptional gene silencing suppressors for increased in planta expression of a recombinant anthrax receptor fusion protein. *Int J Mol Sci*, 12, 4975-90.
- BAESHEN, N. A., BAESHEN, M. N., SHEIKH, A., BORA, R. S., AHMED, M. M., RAMADAN, H. A., SAINI, K. S. & REDWAN, E. M. 2014. Cell factories for insulin production. *Microb Cell Fact*, 13, 141.
- BARBEZ, E., DÜNSER, K., GAIDORA, A., LENDL, T. & BUSCH, W. 2017. Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, E4884-E4893.
- BATOKO, H., ZHENG, H. Q., HAWES, C. & MOORE, I. 2000. A rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus and for normal golgi movement in plants. *Plant Cell*, 12, 2201-18.
- BAUD, S., DICHOW, N. R., KELEMEN, Z., D'ANDREA, S., TO, A., BERGER, N., CANONGE, M., KRONENBERGER, J., VITERBO, D., DUBREUCQ, B., LEPINIEC, L., CHARDOT, T. & MIQUEL, M. 2009. Regulation of HSD1 in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 50, 1463-78.
- BAUD, S., KELEMEN, Z., THÉVENIN, J., BOULARD, C., BLANCHET, S., TO, A., PAYRE, M., BERGER, N., EFFROY-CUZZI, D., FRANCO-ZORRILLA, J. M., GODOY, M., SOLANO, R., THEVENON, E., PARCY, F., LEPINIEC, L. & DUBREUCQ, B. 2016. Deciphering the molecular mechanisms underpinning the transcriptional control of gene expression by master transcriptional regulators in *Arabidopsis* seed. *Plant Physiology*, 171, 1099-1112.
- BENCHABANE, M., GOULET, C., RIVARD, D., FAYE, L., GOMORD, V. & MICHAUD, D. 2008a. Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnol J*, 6, 633-48.

- BENCHABANE, M., GOULET, C., RIVARD, D., FAYE, L., GOMORD, V. & MICHAUD, D. 2008b. Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnology Journal*, 6, 633-648.
- BETHKE, P. C. & JONES, R. L. 2000. Vacuoles and prevacuolar compartments. *Curr Opin Plant Biol*, 3, 469-75.
- BHATIA, S. & DAHIYA, R. 2015. Chapter 8 - Plant-Based Biotechnological Products With Their Production Host, Modes of Delivery Systems, and Stability Testing. In: BHATIA, S., SHARMA, K., DAHIYA, R. & BERA, T. (eds.) *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Boston: Academic Press.
- BOBIK, K., DUBY, G., NIZET, Y., VANDERMEEREN, C., STIERNET, P., KANCZEWSKA, J. & BOUTRY, M. 2010. Two widely expressed plasma membrane H(+)-ATPase isoforms of *Nicotiana tabacum* are differentially regulated by phosphorylation of their penultimate threonine. *Plant J*, 62, 291-301.
- BOSNJAK, I., BOJOVIC, V., SEGVIC-BUBIC, T. & BIELEN, A. 2014. Occurrence of protein disulfide bonds in different domains of life: a comparison of proteins from the Protein Data Bank. *Protein Eng Des Sel*, 27, 65-72.
- BOULARD, C., THÉVENIN, J., TRANQUET, O., LAPORTE, V., LEPINIEC, L. & DUBREUCQ, B. 2018. LEC1 (NF-YB9) directly interacts with LEC2 to control gene expression in seed. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1861, 443-450.
- BRANDIZZI, F., HANTON, S., DASILVA, L. L., BOEVINK, P., EVANS, D., OPARKA, K., DENECKE, J. & HAWES, C. 2003. ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants. *Plant J*, 34, 269-81.
- BRANDIZZI, F., SNAPP, E. L., ROBERTS, A. G., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & HAWES, C. 2002. Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: evidence from selective photobleaching. *The Plant cell*, 14, 1293-1309.
- BRAYBROOK, S. A. & HARADA, J. J. 2008. LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci*, 13, 624-30.
- BRAYBROOK, S. A., STONE, S. L., PARK, S., BUI, A. Q., LE, B. H., FISCHER, R. L., GOLDBERG, R. B. & HARADA, J. J. 2006. Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 3468-3473.
- CARBONERO, P., IGLESIAS-FERNANDEZ, R. & VICENTE-CARBAJOSA, J. 2017. The AFL subfamily of B3 transcription factors: evolution and function in angiosperm seeds. *J Exp Bot*, 68, 871-880.
- CASTILHO, A. & STEINKELLNER, H. 2012. Glyco-engineering in plants to produce human-like N-glycan structures. *Biotechnol J*, 7, 1088-98.
- CASTILHO, A., WINDWARDER, M., GATTINGER, P., MACH, L., STRASSER, R., ALTMANN, F. & STEINKELLNER, H. 2014. Proteolytic and N-glycan processing of human alpha1-antitrypsin expressed in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol*, 166, 1839-51.
- CIRCELLI, P., DONINI, M., VILLANI, M. E., BENVENUTO, E. & MARUSIC, C. 2010. Efficient Agrobacterium-based transient expression system for the production of biopharmaceuticals in plants. *Bioeng Bugs*, 1, 221-4.
- CROFTS, A. J., LEBORGNE-CASTEL, N., HILLMER, S., ROBINSON, D. G., PHILLIPSON, B., CARLSSON, L. E., ASHFORD, D. A. & DENECKE, J. 1999. Saturation of the Endoplasmic Reticulum Retention Machinery Reveals Anterograde Bulk Flow. *The Plant Cell*, 11, 2233.
- CUI, Y., HE, Y., CAO, W., GAO, J. & JIANG, L. 2018. The Multivesicular Body and Autophagosome Pathways in Plants. *Front Plant Sci*, 9, 1837.
- CUI, Y., SHEN, J., GAO, C., ZHUANG, X., WANG, J. & JIANG, L. 2016. Biogenesis of Plant Prevacuolar Multivesicular Bodies. *Mol Plant*, 9, 774-86.
- CURTIS, M. D. & GROSSNIKLAUS, U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant physiology*, 133, 462-469.

- CHRISTENSEN, A. H. & QUAIL, P. H. 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res*, 5, 213-8.
- DE JAEGER, G., SCHEFFER, S., JACOBS, A., ZAMBRE, M., ZOBELL, O., GOOSSENS, A., DEPICKER, A. & ANGENON, G. 2002. Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat Biotechnol*, 20, 1265-8.
- DE MARCHIS, F., BELLUCCI, M. & POMPA, A. 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, 1769-82.
- DE MUYNCK, B., NAVARRE, C. & BOUTRY, M. 2010. Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant Biotechnol J*, 8, 529-63.
- DELIC, M., GÖNGRICH, R., MATTANOVICH, D. & GASSER, B. 2014. Engineering of protein folding and secretion - Strategies to overcome bottlenecks for efficient production of recombinant proteins. *Antioxidants and Redox Signaling*, 21, 414-437.
- DELL, A., GALADARI, A., SASTRE, F. & HITCHEN, P. 2010. Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *Int J Microbiol*, 2010, 148178.
- DEVIC, M. & ROSCOE, T. 2016. Seed maturation: Simplification of control networks in plants. *Plant Science*, 252, 335-346.
- DHONUKSHE, P., ANIENTO, F., HWANG, I., ROBINSON, D. G., MRAVEC, J., STIERHOF, Y. D. & FRIML, J. 2007. Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Curr Biol*, 17, 520-7.
- DI SANSEBASTIANO, G. P., BAROZZI, F., PIRO, G., DENECKE, J. & DE MARCOS LOUSA, C. 2017. Trafficking routes to the plant vacuole: connecting alternative and classical pathways. *J Exp Bot*, 69, 79-90.
- DI SANSEBASTIANO, G. P., PARIS, N., MARC-MARTIN, S. & NEUHAUS, J. M. 1998. Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway. *Plant J*, 15, 449-57.
- DIERYCK, W., PAGNIER, J., POYART, C., MARDEN, M. C., GRUBER, V., BOURNAT, P., BAUDINO, S. & MEROT, B. 1997. Human haemoglobin from transgenic tobacco. *Nature*, 386, 29-30.
- DINNIS, D. M. & JAMES, D. C. 2005. Engineering mammalian cell factories for improved recombinant monoclonal antibody production: Lessons from nature? *Biotechnology and Bioengineering*, 91, 180-189.
- DIRISALA, V. R., NAIR, R. R., SRIRAMA, K., REDDY, P. N., RAO, K. R. S. S., SATYA SAMPATH KUMAR, N. & PARVATAM, G. 2016. Recombinant pharmaceutical protein production in plants: unraveling the therapeutic potential of molecular pharming. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39.
- DIRNBERGER, D., STEINKELLNER, H., ABDENNEBI, L., REMY, J. J. & VAN DE WIEL, D. 2001. Secretion of biologically active glycoforms of bovine follicle stimulating hormone in plants. *Eur. J. Biochem*, 268, 83-101.
- DONINI, M. & MARUSIC, C. 2019. Current state-of-the-art in plant-based antibody production systems. *Biotechnol Lett*, 41, 335-346.
- DRAKE, P. M., SZETO, T. H., PAUL, M. J., TEH, A. Y. & MA, J. K. 2017. Recombinant biologic products versus nutraceuticals from plants - a regulatory choice? *Br J Clin Pharmacol*, 83, 82-87.
- DUGDALE, B., MORTIMER, C. L., KATO, M., JAMES, T. A., HARDING, R. M. & DALE, J. L. 2014. Design and construction of an in-plant activation cassette for transgene expression and recombinant protein production in plants. *Nature Protocols*, 9, 1010.
- EGELKROUT, E., RAJAN, V. & HOWARD, J. A. 2012. Overproduction of recombinant proteins in plants. *Plant Sci*, 184, 83-101.
- ELLSGAARD, L., MCCAUL, N., CHATSISVILI, A. & BRAAKMAN, I. 2016. Co- and Post-Translational Protein Folding in the ER. *Traffic*, 17, 615-38.

- ERBS, G., SILIPO, A., ASLAM, S., DE CASTRO, C., LIPAROTI, V., FLAGIELLO, A., PUCCI, P., LANZETTA, R., PARRILLI, M., MOLINARO, A., NEWMAN, M.-A. & COOPER, R. M. 2008. Peptidoglycan and Muropeptides from Pathogens Agrobacterium and Xanthomonas Elicit Plant Innate Immunity: Structure and Activity. *Chemistry & Biology*, 15, 438-448.
- EVALUATEPHARMA 2018. World Preview 2018, Outlook to 2024. *11th edition of EvaluatePharma's World*.
- FALHOF, J., PEDERSEN, J. T., FUGLSANG, A. T. & PALMGREN, M. 2016. Plasma Membrane H(+)-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Mol Plant*, 9, 323-337.
- FAYE, L., BOULAFLOUS, A., BENCHABANE, M., GOMORD, V. & MICHAUD, D. 2005. Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine*, 23, 1770-8.
- FEENEY, M., FRIGERIO, L., CUI, Y. & MENASSA, R. 2013a. Following vegetative to embryonic cellular changes in leaves of Arabidopsis overexpressing LEAFY COTYLEDON2. *Plant Physiology*, 162, 1881-1896.
- FEENEY, M., FRIGERIO, L., KOHALMI, S. E., CUI, Y. & MENASSA, R. 2013b. Reprogramming cells to study vacuolar development. *Front Plant Sci*, 4, 493.
- FEENEY, M., FRIGERIO, L., KOHALMI, S. E., CUI, Y. & MENASSA, R. 2013c. Reprogramming cells to study vacuolar development. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- FEIGE, M. J. & BUCHNER, J. 2014. Principles and engineering of antibody folding and assembly. *Biochim Biophys Acta*, 1844, 2024-2031.
- FEIGE, M. J., GROSCURTH, S., MARCINOWSKI, M., SHIMIZU, Y., KESSLER, H., HENDERSHOT, L. M. & BUCHNER, J. 2009. An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Mol Cell*, 34, 569-79.
- FEIGE, M. J., HENDERSHOT, L. M. & BUCHNER, J. 2010. How antibodies fold. *Trends Biochem Sci*, 35, 189-98.
- FELLE, H. H. 2001. pH: Signal and Messenger in Plant Cells. *Plant Biology*, 3, 577-591.
- FELLE, H. H., WALLER, F., MOLITOR, A. & KOGEL, K. H. 2009. The mycorrhiza fungus *Piriformospora indica* induces fast root-surface pH signaling and primes systemic alkalization of the leaf apoplast upon powdery mildew infection. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 1179-85.
- FLOSS, D. M., SCHALLAU, K., ROSE-JOHN, S., CONRAD, U. & SCHELLER, J. 2010. Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends Biotechnol*, 28, 37-45.
- FOX, J. L. 2012. First plant-made biologic approved. *Nature Biotechnology*, 30, 472.
- FRANCIN-ALLAMI, M., SAUMONNEAU, A., LAVENANT, L., BOUDER, A., SPARKES, I., HAWES, C. & POPINEAU, Y. 2011. Dynamic trafficking of wheat gamma-gliadin and of its structural domains in tobacco cells, studied with fluorescent protein fusions. *J Exp Bot*, 62, 4507-20.
- FRIGERIO, L., DE VIRGILIO, M., PRADA, A., FAORO, F. & VITALE, A. 1998. Sorting of Phaseolin to the Vacuole Is Saturable and Requires a Short C-Terminal Peptide. *The Plant Cell*, 10, 1031.
- FRIGERIO, L., FORESTI, O., FELIPE, D. H., NEUHAUS, J.-M. & VITALE, A. 2001a. The C-terminal tetrapeptide of phaseolin is sufficient to target green fluorescent protein to the vacuole. *Journal of Plant Physiology*, 158, 499-503.
- FRIGERIO, L., HINZ, G. & ROBINSON, D. G. 2008. Multiple vacuoles in plant cells: rule or exception? *Traffic*, 9, 1564-70.
- FRIGERIO, L., JOLLIFFE, N. A., DI COLA, A., FELIPE, D. H., PARIS, N., NEUHAUS, J.-M., LORD, J. M., CERIOTTI, A. & ROBERTS, L. M. 2001b. The Internal Propeptide of the Ricin Precursor Carries a Sequence-Specific Determinant for Vacuolar Sorting. *Plant Physiology*, 126, 167.
- GATTOLIN, S., SORIEUL, M. & FRIGERIO, L. 2010. Tonoplast intrinsic proteins and vacuolar identity. *Biochem Soc Trans*, 38, 769-73.

- GEILFUS, C.-M., TENHAKEN, R. & CARPENTIER, S. C. 2017. Transient alkalinization of the leaf apoplast stiffens the cell wall during onset of chloride salinity in corn leaves. *The Journal of biological chemistry*, 292, 18800-18813.
- GEILFUS, C. M. 2017. The pH of the Apoplast: Dynamic Factor with Functional Impact Under Stress. *Mol Plant*, 10, 1371-1386.
- GERASIMOVA, S. V., SMIRNOVA, O. G., KOCHETOV, A. V. & SHUMNYI, V. K. 2016. Production of recombinant proteins in plant cells. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63, 26-37.
- GERSHLICK, D. C., LOUSA CDE, M., FORESTI, O., LEE, A. J., PEREIRA, E. A., DASILVA, L. L., BOTTANELLI, F. & DENECKE, J. 2014. Golgi-dependent transport of vacuolar sorting receptors is regulated by COPII, AP1, and AP4 protein complexes in tobacco. *Plant Cell*, 26, 1308-29.
- GJETTING, K. S. K., YTTING, C. K., SCHULZ, A. & FUGLSANG, A. T. 2012. Live imaging of intra- and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor. *Journal of experimental botany*, 63, 3207-3218.
- GOMORD, V. & FAYE, L. 2004. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 7, 171-81.
- GOMORD, V., FITCHETTE, A. C., CATALANA, V. & FAYE, L. 2013. *Production Commerciale De Peptidases C1a Par Expression Transitoire Chez Les Plantes*.
- GOMORD, V., FITCHETTE, A. C., MENU-BOUAOUICHE, L., SAINT-JORE-DUPAS, C., PLASSON, C., MICHAUD, D. & FAYE, L. 2010. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnol J*, 8, 564-87.
- GONZÁLES, C. 2010. *Construcción y expresión de una proteína de fusión C-terminal entre la cadena LC del anticuerpo 14D9 y una proteína fluorescente roja*.
- GOULET, C., KHALF, M., SAINSBURY, F., D'AOUST, M. A. & MICHAUD, D. 2012. A protease activity-depleted environment for heterologous proteins migrating towards the leaf cell apoplast. *Plant Biotechnol J*, 10, 83-94.
- GRAHAM IAN, A. & PENFIELD, S. 2007. *Transgenic Plant Cells Expressing A Transcription Factor Relating To Seed Dormancy*. WO patent application GB 2006003971 W. 2007/06/14.
- GRIMBERG, A., CARLSSON, A. S., MARTTILA, S., BHALERAO, R. & HOFVANDER, P. 2015. Transcriptional transitions in *Nicotiana benthamiana* leaves upon induction of oil synthesis by WRINKLED1 homologs from diverse species and tissues. *BMC Plant Biol*, 15, 192.
- GROSSE-HOLZ, F., KELLY, S., BLASKOWSKI, S., KASCHANI, F., KAISER, M. & VAN DER HOORN, R. A. L. 2018. The transcriptome, extracellular proteome and active secretome of agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana* uncover a large, diverse protease repertoire. *Plant Biotechnol J*, 16, 1068-1084.
- GUANG-YUH JAUH, A. M. F., HOWARD D. GRIMES, CLARENCE A. RYAN, JR., & ROGERS, A. J. C. 1998. Delta Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12995-12999.
- GULIS, G., SIMI, K. C. R., DE TOLEDO, R. R., MARANHAO, A. Q. & BRIGIDO, M. M. 2014. Optimization of heterologous protein production in Chinese hamster ovary cells under overexpression of spliced form of human X-box binding protein. *BMC Biotechnology*, 14.
- GUSTAFSSON, C., MINSHULL, J., GOVINDARAJAN, S., NESS, J., VILLALOBOS, A. & WELCH, M. 2012. Engineering genes for predictable protein expression. *Protein Expr Purif*, 83, 37-46.
- GUTTERSON, N. I., RATCLIFFE, O. J., REUBER, T. L., CENTURY, K. S., KROLIKOWSKI, K., COSTA, J., CREELMAN, R. A., HEMPEL, F. D., KUMIMOTO, R. W., QUEEN, E. L., REPETTI, P. P. & ADAM, L. U. C. 2009. *Stress Tolerance In Plants*. US patent application US 6496106 A. 2009/10/22.
- GUTTERSON, N. I., RATCLIFFE, O. J., QUEEN, E. L., REUBER, T. L., CENTURY, K. S. & CANALES, R. D. 2008. *Conferring Biotic And Abiotic Stress Tolerance In Plants*. US patent application US 98157607 A. 2008/12/04.

- HAAS, A. K., VON SCHWERIN, C., MATSCHEKO, D. & BRINKMANN, U. 2010. Fluorescent Citrine-IgG fusion proteins produced in mammalian cells. *MAbs*, 2, 648-61.
- HADLINGTON, J. L., SANTORO, A., NUTTALL, J., DENECKE, J., MA, J. K., VITALE, A. & FRIGERIO, L. 2003. The C-terminal extension of a hybrid immunoglobulin A/G heavy chain is responsible for its Golgi-mediated sorting to the vacuole. *Mol Biol Cell*, 14, 2592-602.
- HARA-NISHIMURA, I., MATSUSHIMA, R., SHIMADA, T. & NISHIMURA, M. 2004. Diversity and formation of endoplasmic reticulum-derived compartments in plants. Are these compartments specific to plant cells? *Plant Physiol*, 136, 3435-9.
- HARA-NISHIMURA, I., SHIMADA, T., HATANO, K., TAKEUCHI, Y. & NISHIMURA, M. 1998. Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell*, 10, 825-36.
- HARADA, J., KWONG, L. & YEE, K. M. 2002. *Leafy cotyledon2 genes and their uses*. US09527058. 2002-12-10.
- HARADA, J., STONE, S. & PELLETIER, J. 2009. *Methods Of Modulating Cytokinin Related Processes In A Plant Using B3 Domain Proteins*. US patent application US 58809206 A. 2009/11/03.
- HARADA, J. J., LOTAN, T., OHTO, M., GOLDBERG, R. B. & FISCHER, R. L. 2001. *Leafy cotyledon1 genes and methods of modulating embryo development in transgenic plants*. US09103478. 2001-05-22.
- HARRISON, M. D., GEIJSKES, J., COLEMAN, H. D., SHAND, K., KINKEMA, M., PALUPE, A., HASSALL, R., SAINZ, M., LLOYD, R., MILES, S. & DALE, J. L. 2011. Accumulation of recombinant cellobiohydrolase and endoglucanase in the leaves of mature transgenic sugar cane. *Plant Biotechnology Journal*, 9, 884-896.
- HARRISON, M. D., GEIJSKES, R. J., LLOYD, R., MILES, S., PALUPE, A., SAINZ, M. B. & DALE, J. L. 2014. Recombinant cellulase accumulation in the leaves of mature, vegetatively propagated transgenic sugarcane. *Molecular Biotechnology*, 56, 795-802.
- HASEGAWA, H., WENDLING, J., HE, F., TRILISKY, E., STEVENSON, R., FRANEY, H., KINDERMAN, F., LI, G., PIEDMONTE, D. M., OSSLUND, T., SHEN, M. & KETCHEM, R. R. 2011. In vivo crystallization of human IgG in the endoplasmic reticulum of engineered Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J Biol Chem*, 286, 19917-31.
- HAWES, C., KIVINIEMI, P. & KRIECHBAUMER, V. 2015. The endoplasmic reticulum: a dynamic and well-connected organelle. *J Integr Plant Biol*, 57, 50-62.
- HELENIUS, A. & AEBI, M. 2004. Roles of N-Linked Glycans in the Endoplasmic Reticulum. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 1019-1049.
- HINZ, G., COLANESI, S., HILLMER, S., ROGERS, J. C. & ROBINSON, D. G. 2007. Localization of vacuolar transport receptors and cargo proteins in the Golgi apparatus of developing Arabidopsis embryos. *Traffic*, 8, 1452-64.
- HINZ, G., HILLMER, S., BAUMER, M. & HOHL, I. I. 1999. Vacuolar storage proteins and the putative vacuolar sorting receptor BP-80 exit the golgi apparatus of developing pea cotyledons in different transport vesicles. *Plant Cell*, 11, 1509-24.
- HOHL, I., ROBINSON, D. G., CHRISPEELS, M. J. & HINZ, G. 1996. Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat. *J Cell Sci*, 109 (Pt 10), 2539-50.
- HOOD, E. E. 2002. From green plants to industrial enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 279-283.
- HRISTODOROV, D., FISCHER, R. & LINDEN, L. 2013. With or without sugar? (A)glycosylation of therapeutic antibodies. *Mol Biotechnol*, 54, 1056-68.
- HUANG, M., WANG, G., QIN, J., PETRANOVIC, D. & NIELSEN, J. 2018. Engineering the protein secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* enables improved protein production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, E11025-E11032.

- HUNTER, P. R., CRADDOCK, C. P., DI BENEDETTO, S., ROBERTS, L. M. & FRIGERIO, L. 2007. Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in Arabidopsis cells. *Plant Physiol*, 145, 1371-82.
- IRONS, S. L., NUTTALL, J., FLOSS, D. M., FRIGERIO, L., KOTZER, A. M. & HAWES, C. 2008. Fluorescent protein fusions to a human immunodeficiency virus monoclonal antibody reveal its intracellular transport through the plant endomembrane system. *Plant Biotechnol J*, 6, 649-62.
- ITO, Y., UEMURA, T. & NAKANO, A. 2014. Formation and maintenance of the Golgi apparatus in plant cells. *Int Rev Cell Mol Biol*, 310, 221-87.
- JACQUINOD, M., VILLIERS, F., KIEFFER-JACQUINOD, S., HUGOUVIEUX, V., BRULEY, C., GARIN, J. & AND BOURGUIGNON, J. 2007. A proteomics dissection of Arabidopsis thaliana vacuoles isolated from cell culture. *Mol. Cell Proteomics*, 6, 394-412.
- JHA, S., AGARWAL, S., SANYAL, I., JAIN, G. K. & AMLA, D. V. 2012. Differential subcellular targeting of recombinant human α 1-proteinase inhibitor influences yield, biological activity and in planta stability of the protein in transgenic tomato plants. *Plant Science*, 196, 53-66.
- JIA, H., MCCARTY, D. R. & SUZUKI, M. 2013. Distinct roles of LAFL network genes in promoting the embryonic seedling fate in the absence of VAL repression. *Plant Physiology*, 163, 1293-1305.
- JIA, H., SUZUKI, M. & MCCARTY, D. R. 2014. Regulation of the seed to seedling developmental phase transition by the LAFL and VAL transcription factor networks. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 3, 135-45.
- JIANG, L., PHILLIPS, T. E., ROGERS, S. W. & ROGERS, J. C. 2000. Biogenesis of the protein storage vacuole crystalloid. *The Journal of cell biology*, 150, 755-770.
- JO, L., PELLETIER, J. M. & HARADA, J. J. 2019. Central role of the LEAFY COTYLEDON1 transcription factor in seed development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 61, 564-580.
- JOENSUU, J. J., CONLEY, A. J., LIENEMANN, M., BRANDLE, J. E., LINDER, M. B. & MENASSA, R. 2010. Hydrophobin Fusions for High-Level Transient Protein Expression and Purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology*, 152, 622-633.
- JOLLIFFE, N. A., CRADDOCK, C. P. & FRIGERIO, L. 2005. Pathways for protein transport to seed storage vacuoles. *Biochem Soc Trans*, 33, 1016-8.
- JUAREZ, P., HUET-TRUJILLO, E., SARRION-PERDIGONES, A., FALCONI, E. E., GRANELL, A. & ORZAEZ, D. 2013. Combinatorial Analysis of Secretory Immunoglobulin A (sIgA) Expression in Plants. *Int J Mol Sci*, 14, 6205-22.
- JULVE PARRENO, J. M., HUET, E., FERNANDEZ-DEL-CARMEN, A., SEGURA, A., VENTURI, M., GANDIA, A., PAN, W. S., ALBALADEJO, I., FORMENT, J., PLA, D., WIGDOROVITZ, A., CALVETE, J. J., GUTIERREZ, C., GUTIERREZ, J. M., GRANELL, A. & ORZAEZ, D. 2018. A synthetic biology approach for consistent production of plant-made recombinant polyclonal antibodies against snake venom toxins. *Plant Biotechnol J*, 16, 727-736.
- JUTRAS, P. V., D'AOUST, M. A., COUTURE, M. M., VEZINA, L. P., GOULET, M. C., MICHAUD, D. & SAINSBURY, F. 2015a. Modulating secretory pathway pH by proton channel co-expression can increase recombinant protein stability in plants. *Biotechnol J*, 10, 1478-86.
- JUTRAS, P. V., D'AOUST, M. A., COUTURE, M. M. J., VEZINA, L. P., GOULET, M. C., MICHAUD, D. & SAINSBURY, F. 2015b. Modulating secretory pathway pH by proton channel co-expression can increase recombinant protein stability in plants. *Biotechnology Journal*, 10, 1478-1486.
- JUTRAS, P. V., GOULET, M. C., LAVOIE, P. O., D'AOUST, M. A., SAINSBURY, F. & MICHAUD, D. 2018. Recombinant protein susceptibility to proteolysis in the plant cell secretory pathway is pH-dependent. *Plant Biotechnology Journal*, 16, 1928-1938.

- KADOKURA, S., SUGIMOTO, K., TARR, P., SUZUKI, T. & MATSUNAGA, S. 2018. Characterization of somatic embryogenesis initiated from the Arabidopsis shoot apex. *Developmental Biology*, 442, 13-27.
- KAUFMANN, H. 2014. Genetic engineering of cells: Cell Line evolution and engineering. *Animal Cell Biotechnology: In Biologics Production*.
- KO, K., STEPLEWSKI, Z., GLOGOWSKA, M. & KOPROWSKI, H. 2005. Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 7026-30.
- KOUL, B., YADAV, R., SANYAL, I., SAWANT, S., SHARMA, V. & AMLA, D. V. 2012. Cis-acting motifs in artificially synthesized expression cassette leads to enhanced transgene expression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Physiol Biochem*, 61, 131-41.
- KOVALSKAYA, N., FOSTER-FREY, J., DONOVAN, D. M., BAUCHAN, G. & HAMMOND, R. W. 2015. Antimicrobial activity of bacteriophage endolysin produced in nicotiana benthamiana plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 160-170.
- KROJ, T., SAVINO, G., VALON, C., GIRAUDAT, J. & PARCY, F. 2003. Regulation of storage protein gene expression in Arabidopsis. *Development*, 130, 6065.
- KUNZL, F., FRUHOLZ, S., FASSLER, F., LI, B. & PIMPL, P. 2016. Receptor-mediated sorting of soluble vacuolar proteins ends at the trans-Golgi network/early endosome. *Nat Plants*, 2, 16017.
- LANNOO, N. & VAN DAMME, E. J. 2015. Review/N-glycans: The making of a varied toolbox. *Plant Sci*, 239, 67-83.
- LAREU, F., MANGANO, S., LOOS, A., STEINKELLNER, H. & S, P. 2013. RE: Vacuolar transport and deposition of mAbs in *N. benthamiana* leaves. Type to PLANT BASED VACCINES, A. A. B. P.
- LARRICK, J. W., YU, L., NAFTZGER, C., JAISWAL, S. & WYCOFF, K. 2001. Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomolecular Engineering*, 18, 87-94.
- LIEBMINGER, E., VEIT, C., PABST, M., BATOUX, M., ZIPFEL, C., ALTMANN, F., MACH, L. & STRASSER, R. 2011. Beta-N-acetylhexosaminidases HEXO1 and HEXO3 are responsible for the formation of paucimannosidic N-glycans in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem*, 286, 10793-802.
- LIU, F., REN, Y., WANG, Y., PENG, C., ZHOU, K., LV, J., GUO, X., ZHANG, X., ZHONG, M., ZHAO, S., JIANG, L., WANG, H., BAO, Y. & WAN, J. 2013. OsVPS9A functions cooperatively with OsRAB5A to regulate post-Golgi dense vesicle-mediated storage protein trafficking to the protein storage vacuole in rice endosperm cells. *Mol Plant*, 6, 1918-32.
- LOHAUS, G., PENNEWISS, K., SATTELMACHER, B., HUSSMANN, M. & HERMANN MUEHLING, K. 2001. Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiol Plant*, 111, 457-465.
- LOMONOSSOFF, G. P. & D'AOUST, M. A. 2016. Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment. *Science*, 353, 1237-40.
- LOOS, A., GRUBER, C., ALTMANN, F., MEHOFER, U., HENSEL, F., GRANDITS, M., OOSTENBRINK, C., STADLMAYR, G., FURTMULLER, P. G. & STEINKELLNER, H. 2014. Expression and glycoengineering of functionally active heteromultimeric IgM in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 6263-8.
- LOOS, A., VAN DROOGENBROECK, B., HILLMER, S., GRASS, J., KUNERT, R., CAO, J., ROBINSON, D. G., DEPICKER, A. & STEINKELLNER, H. 2011a. Production of monoclonal antibodies with a controlled N-glycosylation pattern in seeds of Arabidopsis thaliana. *Plant Biotechnology Journal*, 9, 179-192.
- LOOS, A., VAN DROOGENBROECK, B., HILLMER, S., GRASS, J., KUNERT, R., CAO, J., ROBINSON, D. G., DEPICKER, A. & STEINKELLNER, H. 2011b. Production of monoclonal antibodies with a controlled N-glycosylation pattern in seeds of Arabidopsis thaliana. *Plant Biotechnol J*, 9, 179-92.

- LOOS, A., VAN DROOGENBROECK, B., HILLMER, S., GRASS, J., PABST, M., CASTILHO, A., KUNERT, R., LIANG, M., ARCALIS, E., ROBINSON, D. G., DEPICKER, A. & STEINKELLNER, H. 2011c. Expression of Antibody Fragments with a Controlled N-glycosylation Pattern and Induction of Endoplasmic Reticulum-Derived Vesicles in Seeds of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 155, 2036.
- LOOS, A., VAN DROOGENBROECK, B., HILLMER, S., GRASS, J., PABST, M., CASTILHO, A., KUNERT, R., LIANG, M., ARCALIS, E., ROBINSON, D. G., DEPICKER, A. & STEINKELLNER, H. 2011d. Expression of antibody fragments with a controlled N-glycosylation pattern and induction of endoplasmic reticulum-derived vesicles in seeds of Arabidopsis. *Plant Physiol*, 155, 2036-48.
- MA, J., HIATT, A., HEIN, M., VINE, N., WANG, F., STABILA, P., DOLLEWEERD, C., MOSTOV, K. Y. & LEHNER, T. 1995. Generation and Assembly of Secretory Antibodies in Plants. *Science*, 268, 716-719.
- MA, J. K., DROSSARD, J., LEWIS, D., ALTMANN, F., BOYLE, J., CHRISTOU, P., COLE, T., DALE, P., VAN DOLLEWEERD, C. J., ISITT, V., KATINGER, D., LOBEDAN, M., MERTENS, H., PAUL, M. J., RADEMACHER, T., SACK, M., HUNDLEBY, P. A., STIEGLER, G., STOGER, E., TWYMAN, R. M., VCELAR, B. & FISCHER, R. 2015. Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J*, 13, 1106-20.
- MAJDA, M. & ROBERT, S. 2018. The Role of Auxin in Cell Wall Expansion. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 951.
- MAKSIMENKO, O. G., DEYKIN, A. V., KHODAROVICH, Y. M. & GEORGIEV, P. G. 2013. Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems. *Acta naturae*, 5, 33-46.
- MANGANO, S., GONZALEZ, C. D. & PETRUCCELLI, S. 2014. Agrobacterium tumefaciens-mediated transient transformation of Arabidopsis thaliana leaves. *Methods Mol Biol*, 1062, 165-73.
- MAPP BIOPHARMACEUTICALS 2015. LeafBio Announces Acceptance of Investigational New Drug Application for Ebola Therapy ZMap™. San Diego: In Press.
- MARIN VIEGAS, V. S., ACEVEDO, G. R., BAYARDO, M. P., CHIRDO, F. G. & PETRUCCELLI, S. 2015. Production of the Main Celiac Disease Autoantigen by Transient Expression in Nicotiana benthamiana. *Front Plant Sci*, 6, 1067.
- MARIN VIEGAS, V. S., OCAMPO, C. G. & PETRUCCELLI, S. 2017. Vacuolar deposition of recombinant proteins in plant vegetative organs as a strategy to increase yields. *Bioengineered*, 8, 203-211.
- MARKETS & MARKETS 2019. Protein expression market by type (E. coli, mammalian, yeast, Pichia, insect, baculovirus, cell-free), products (competent cells, reagents, instruments, services), application (therapeutic, research, industrial) & end user - global forecast to 2022. *Report Code BT 2435*.
- MARTY, F. 1999. Plant Vacuoles. *The Plant Cell*, 11, 587-599.
- MATSUOKA, K. A. N., J.-M. 1999. Cis-elements of protein transport to the plant vacuoles. *J. Exp. Bot*, 50, 165-174.
- MAURO, V. P. & CHAPPELL, S. A. 2014. A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *Trends Mol Med*, 20, 604-13.
- MCNULTY, M. J., GLEBA, Y., TUSE, D., HAHN-LOBMANN, S., GIRITCH, A., NANDI, S. & MCDONALD, K. A. 2019. Techno-economic analysis of a plant-based platform for manufacturing antimicrobial proteins for food safety. *Biotechnol Prog*, e2896.
- MIAO, Y., LI, K. Y., LI, H. Y., YAO, X. & JIANG, L. 2008. The vacuolar transport of aleurain-GFP and 2S albumin-GFP fusions is mediated by the same pre-vacuolar compartments in tobacco BY-2 and Arabidopsis suspension cultured cells. *Plant J*, 56, 824-39.
- MIAO, Y., YAN, P. K., KIM, H., HWANG, I. & JIANG, L. 2006. Localization of green fluorescent protein fusions with the seven Arabidopsis vacuolar sorting receptors to prevacuolar compartments in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol*, 142, 945-62.

- Ministerio de Economía y Finanzas Públicas. 2018. *Informes de Cadenas Productivas: COMPLEJO FARMACÉUTICO. Secretaría de Política Económica y Planificación del Desarrollo, Ministerio de Economía y Finanzas Públicas.*
- MIR-ARTIGUES, P., TWYMAN, R. M., ALVAREZ, D., CERDA BENNASSER, P., BALCELLS, M., CHRISTOU, P. & CAPELL, T. 2019. A simplified techno-economic model for the molecular pharming of antibodies. *Biotechnol Bioeng*, 116, 2526-2539.
- MISAKI, R., SAKAI, Y., OMASA, T., FUJIYAMA, K. & SEKI, T. 2011. N-terminal vacuolar sorting signal at the mouse antibody alters the N-linked glycosylation pattern in suspension-cultured tobacco BY2 cells. *J Biosci Bioeng*, 112, 476-84.
- MITSUHASHI, N., HAYASHI, Y., KOUMOTO, Y., SHIMADA, T., FUKASAWA-AKADA, T., NISHIMURA, M. AND HARA-NISHIMURA, I. 2001. A novel membrane protein that is transported to protein storage vacuoles via precursor-accumulating vesicles. *The Plant Cell*, 13, 2361-2372.
- MOUSTAFA, K., MAKHZOUM, A. & TREMOUILLAUX-GUILLER, J. 2016. Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations. *Crit Rev Biotechnol*, 36, 840-50.
- NAKAGAWA, T., KUROSE, T., HINO, T., TANAKA, K., KAWAMUKAI, M., NIWA, Y., TOYOOKA, K., MATSUOKA, K., JINBO, T. & KIMURA, T. 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng*, 104, 34-41.
- NAKAMURA, K. & MATSUOKA, K. 1993. Protein targeting to the vacuole in plant cells. *Plant physiology*, 101, 1-5.
- NANDI, S., KWONG, A. T., HOLTZ, B. R., ERWIN, R. L., MARCEL, S. & MCDONALD, K. A. 2016. Techno-economic analysis of a transient plant-based platform for monoclonal antibody production. *MAbs*, 8, 1456-1466.
- NAUSCH, H., MIKSCHOFSKY, H., KOSLOWSKI, R., MEYER, U., BROER, I. & HUCKAUF, J. 2012. Expression and subcellular targeting of human complement factor C5a in Nicotiana species. *PLoS One*, 7, e53023.
- NELSON, B. K., CAI, X. & NEBENFUHR, A. 2007. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J*, 51, 1126-36.
- NEUHAUS, J. M. & ROGERS, J. C. 1998. Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol Biol*, 38, 127-44.
- NIEMER, M., MEHOFER, U., TORRES ACOSTA, J. A., VERDIANZ, M., HENKEL, T., LOOS, A., STRASSER, R., MARESCH, D., RADEMACHER, T., STEINKELLNER, H. & MACH, L. 2014. The human anti-HIV antibodies 2F5, 2G12, and PG9 differ in their susceptibility to proteolytic degradation: down-regulation of endogenous serine and cysteine proteinase activities could improve antibody production in plant-based expression platforms. *Biotechnol J*, 9, 493-500.
- NIEMES, S., LABS, M., SCHEURING, D., KRUEGER, F., LANGHANS, M., JESENOFSKY, B., ROBINSON, D. G. & PIMPL, P. 2010a. Sorting of plant vacuolar proteins is initiated in the ER. *The Plant Journal*, 62, 601-614.
- NIEMES, S., LANGHANS, M., VIOTTI, C., SCHEURING, D., SAN WAN YAN, M., JIANG, L., HILLMER, S., ROBINSON, D. G. & PIMPL, P. 2010b. Retromer recycles vacuolar sorting receptors from the trans-Golgi network. *Plant J*, 61, 107-21.
- NISHIZAWA, K., MARUYAMA, N. & UTSUMI, S. 2006. The C-terminal region of α' subunit of soybean β -conglycinin contains two types of vacuolar sorting determinants. *Plant Molecular Biology*, 62, 111-125.
- OCAMPO, C. G., LAREU, F., MARIN VIEGAS, V. S., MANGANO, S., LOOS, A., STEINKELLNER, H. & PETRUCCELLI, S. 2016a. Vacuolar targeting of recombinant antibodies in Nicotiana benthamiana *Plant Biotechnol J*, 14, 2265-2275. .
- OCAMPO, C. G., LAREU, J. F., MARIN VIEGAS, V. S., MANGANO, S., LOOS, A., STEINKELLNER, H. & PETRUCCELLI, S. 2016b. Vacuolar targeting of recombinant antibodies in Nicotiana benthamiana. *Plant Biotechnol J*, 14, 2265-2275.

- ODELL, J. T., NAGY, F. & CHUA, N.-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313, 810-812.
- OKUDA, A., MATSUSAKI, M., MASUDA, T. & URADE, R. 2017. Identification and characterization of GmPDIL7, a soybean ER membrane-bound protein disulfide isomerase family protein. *FEBS J*, 284, 414-428.
- OLIVEIRA, A., PEREIRA, C., COSTA, D. S. D., TEIXEIRA, J., FIDALGO, F., PEREIRA, S. & PISSARRA, J. 2010. Characterization of aspartic proteinases in *C. cardunculus* L. callus tissue for its prospective transformation. *Plant Science*, 178, 140-146.
- ONDA, Y. 2013. Oxidative protein-folding systems in plant cells. *Int J Cell Biol*, 2013, 585431.
- ORZAEZ, D., GRANELL, A. & BLAZQUEZ, M. A. 2009. Manufacturing antibodies in the plant cell. *Biotechnol J*, 4, 1712-24.
- OTEGUI, M. S., NOH, Y. S., MARTINEZ, D. E., VILA PETROFF, M. G., STAEHELIN, L. A., AMASINO, R. M. & GUIAMET, J. J. 2005. Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant J*, 41, 831-44.
- PARIS, N., STANLEY, C., JONES, R. L. & AND ROGERS, J. C. 1996. Plant Cells Contain Two Functionally Distinct Vacuolar Compartments. *Cell*, 85, 563-572.
- PATIL, N. A., TAILHADES, J., HUGHES, R. A., SEPAROVIC, F., WADE, J. D. & HOSSAIN, M. A. 2015. Cellular disulfide bond formation in bioactive peptides and proteins. *Int J Mol Sci*, 16, 1791-805.
- PATTISON, R. J. & AMTMANN, A. 2009. N-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants. *Trends Plant Sci*, 14, 92-9.
- PAUL, M., RELJIC, R., KLEIN, K., DRAKE, P. M., VAN DOLLEWEERD, C., PABST, M., WINDWARDER, M., ARCALIS, E., STOGER, E., ALTMANN, F., COSGROVE, C., BARTOLF, A., BADEN, S. & MA, J. K. 2014. Characterization of a plant-produced recombinant human secretory IgA with broad neutralizing activity against HIV. *MAbs*, 6, 1585-97.
- PAUL, M. J., THANGARAJ, H. & MA, J. K. 2015. Commercialization of new biotechnology: a systematic review of 16 commercial case studies in a novel manufacturing sector. *Plant Biotechnol J*, 13, 1209-20.
- PEREIRA, C., PEREIRA, S. & PISSARRA, J. 2014. Delivering of proteins to the plant vacuole--an update. *International journal of molecular sciences*, 15, 7611-7623.
- PEREIRA, C., PEREIRA, S., SATIAT-JEUNEMAITRE, B. & PISSARRA, J. 2013. Cardosin A contains two vacuolar sorting signals using different vacuolar routes in tobacco epidermal cells. *Plant J*, 76, 87-100.
- PETRUCCELLI, S. 2019. Deposition of Foreign Proteins in Plant Vacuoles: A Unique Characteristic of Plant-Based Platforms. In: BERHARDT, L. V. (ed.) *Advances in Medicine and Biology*. USA: Nova Publisher.
- PETRUCCELLI, S., OTEGUI, M. S., LAREU, F., TRAN DINH, O., FITCHETTE, A. C., CIRCOSTA, A., RUMBO, M., BARDOR, M., CARCAMO, R., GOMORD, V. & BEACHY, R. N. 2006a. A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds. *Plant Biotechnol J*, 4, 511-27.
- PETRUCCELLI, S., OTEGUI, M. S., LAREU, F., TRAN DINH, O., FITCHETTE, A. C., CIRCOSTA, A., RUMBO, M., BARDOR, M., CARCAMO, R., GOMORD, V. & BEACHY, R. N. 2006b. A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds. *Plant Biotechnology Journal*, 4, 511-527.
- PILLAY, P., KUNERT, K. J., VAN WYK, S., MAKGOPA, M. E., CULLIS, C. A. & VORSTER, B. J. 2016. Agroinfiltration contributes to VP1 recombinant protein degradation. *Bioengineered*, 7, 459-477.
- PIMPL, P., TAYLOR, J. P., SNOWDEN, C., HILLMER, S., ROBINSON, D. G. & DENECKE, J. 2006. Golgi-mediated vacuolar sorting of the endoplasmic reticulum chaperone BiP may play an active role in quality control within the secretory pathway. *The Plant cell*, 18, 198-211.

- PRABAKARAN, S., LIPPENS, G., STEEN, H. & GUNAWARDENA, J. 2012. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 4, 565-83.
- PUEYO, J. J., CHRISPPEELS, M. J. & HERMAN, E. M. 1995. Degradation of transport-competent destabilized phaseolin with a signal for retention in the endoplasmic reticulum occurs in the vacuole. *Planta*, 196, 586-96.
- PYBUS, L. P., DEAN, G., WEST, N. R., SMITH, A., DARAMOLA, O., FIELD, R., WILKINSON, S. J. & JAMES, D. C. 2014. Model-directed engineering of "difficult-to-express" monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 111, 372-385.
- QUAX, T. E., CLAASSENS, N. J., SOLL, D. & VAN DER OOST, J. 2015. Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression. *Mol Cell*, 59, 149-61.
- RATCLIFFE, O., RIECHMANN JOSE, L., ADAM LUC, J., DUBELL ARNOLD, N., HEARD JACQUELINE, E., PILGRIM MARSHA, L., JIANG, C.-Z., REUBER, T. L., CREELMAN ROBERT, A., PINEDA, O., YU, G.-L. & BROUN PIERRE, E. 2007. *Yield-related Polynucleotides And Polypeptides In Plants*. US patent application US 22506602 A. 2007/07/03.
- RESKI, R., PARSONS, J. & DECKER, E. L. 2015. Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside. *Plant Biotechnol J*, 13, 1191-8.
- REYMOND, J. L., JAHANGIRI, G. K., STOUDT, C. & LERNER, R. A. 1993. Antibody catalyzed hydrolysis of enol ethers. *Journal of the American Chemical Society*, 115, 3909-3917.
- ROBERT, S., JUTRAS, P. V., KHALF, M., D'AOUST, M. A., GOULET, M. C., SAINSBURY, F. & MICHAUD, D. 2016. Companion protease inhibitors for the in situ protection of recombinant proteins in plants. *Methods in Molecular Biology*.
- ROBERT, S., KHALF, M., GOULET, M.-C., D'AOUSTM-A, S. F. & D., A. M. 2013a. Protection of Recombinant Mammalian Antibodies from Development-Dependent Proteolysis in Leaves of *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One*, 8, e70203.
- ROBERT, S., KHALF, M., GOULET, M. C., D'AOUST, M. A., SAINSBURY, F. & MICHAUD, D. 2013b. Protection of recombinant mammalian antibodies from development-dependent proteolysis in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One*, 8, e70203.
- ROBINSON, D. G., OLIVIUSSON, P. & HINZ, G. 2005. Protein Sorting to the Storage Vacuoles of Plants: A Critical Appraisal. *Traffic*, 6, 615-625.
- ROBINSON, D. G. & PIMPL, P. 2014. Receptor-mediated transport of vacuolar proteins: a critical analysis and a new model. *Protoplasma*, 251, 247-64.
- SABALZA, M., VAMVAKA, E., CHRISTOU, P. & CAPELL, T. 2013. Seeds as a production system for molecular pharming applications: status and prospects. *Curr Pharm Des*, 19, 5543-52.
- SABERIANFAR, R., SATTARZADEH, A., JOENSUU, J. J., KOHALMI, S. E. & MENASSA, R. 2016. Protein Bodies in Leaves Exchange Contents through the Endoplasmic Reticulum. *Front Plant Sci*, 7, 693.
- SABERIANFAR, R. A. M., R. 2018. Strategies to Increase Expression and Accumulation of Recombinant Proteins. *Molecular Pharming*.
- SACK, M., HOFBAUER, A., FISCHER, R. & STOGER, E. 2015. The increasing value of plant-made proteins. *Curr Opin Biotechnol*, 32, 163-170.
- SAINSBURY, F., THUENEMANN, E. C. & LOMONOSSOFF, G. P. 2009. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J*, 7, 682-93.
- SAKURAI, N. 1998. Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. *Journal of Plant Research*, 111, 133-148.
- SANTOS MENDOZA, M., DUBREUCQ, B., MIQUEL, M., CABOCHE, M. & LEPINIEC, L. 2005. LEAFY COTYLEDON 2 activation is sufficient to trigger the accumulation of oil and seed specific mRNAs in *Arabidopsis* leaves. *FEBS Letters*, 579, 4666-4670.
- SCHILLBERG, S., TWYMAN, R. M. & FISCHER, R. 2005. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants--technology assessment. *Vaccine*, 23, 1764-9.

- SCHNEIDER, J., CASTILHO, A., PABST, M., ALTMANN, F., GRUBER, C., STRASSER, R., GATTINGER, P., SEIFERT, G. J. & STEINKELLNER, H. 2015. Characterization of plants expressing the human beta1,4-galactosyltransferase gene. *Plant Physiol Biochem*, 92, 39-47.
- SHAALTIEL, Y., BARTFELD, D., HASHMUELI, S., BAUM, G., BRILL-ALMON, E., GALILI, G., DYM, O., BOLDIN-ADAMSKY, S. A., SILMAN, I., SUSSMAN, J. L., FUTERMAN, A. H. & AVIEZER, D. 2007. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J*, 5, 579-90.
- SHAALTIEL, Y., HASHMUELI, S., BARTFELD, D., BAUM, G., RATZ, T., MIZRACHI, E. & AND FORSTER, Y. 2012. *System and method for production of antibodies in plant cell culture*.
- SHAFFER, A. L., SHAPIRO-SHELEF, M., IWAKOSHI, N. N., LEE, A. H., QIAN, S. B., ZHAO, H., YU, X., YANG, L., TAN, B. K., ROSENWALD, A., HURT, E. M., PETROULAKIS, E., SONENBERG, N., YEWDELL, J. W., CALAME, K., GLIMCHER, L. H. & STAUDT, L. M. 2004. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*, 21, 81-93.
- SHEN, Y., WANG, J., DING, Y., LO, S. W., GOUZERH, G., NEUHAUS, J. M. & JIANG, L. 2011. The rice RMR1 associates with a distinct prevacuolar compartment for the protein storage vacuole pathway. *Mol Plant*, 4, 854-68.
- SHIMADA, T., FUJI, K., TAMURA, K., KONDO, M., NISHIMURA, M. & HARA-NISHIMURA, I. 2003. Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 16095-100.
- SHIMADA, T., WATANABE, E., TAMURA, K., HAYASHI, Y., NISHIMURA, M. & HARA-NISHIMURA, I. 2002. A vacuolar sorting receptor PV72 on the membrane of vesicles that accumulate precursors of seed storage proteins (PAC vesicles). *Plant Cell Physiol*, 43, 1086-95.
- SHOSEYOV, O., POSEN, Y. & GRYNSPAN, F. 2014. Human collagen produced in plants: more than just another molecule. *Bioengineered*, 5, 49-52.
- SMIGOCKI, A. C. & BRUCCOLERI, R. E. 2017. *Genetically Altered Plants Producing Fatty Acids*. US patent application US 201615226106 A. 2017/02/09.
- SONG, I., KANG, Y., LEE, Y. K., MYUNG, S. C. & KO, K. 2018. Endoplasmic reticulum retention motif fused to recombinant anti-cancer monoclonal antibody (mAb) CO17-1A affects mAb expression and plant stress response. *PLoS One*, 13, e0198978.
- SOURROUILLE, C., MARQUET-BLOUIN, E., D'AOUST, M. A., KIEFFER-MEYER, M. C., SEVENO, M., PAGNY-SALEHABADI, S., BARDOR, M., DURAMBUR, G., LEROUGE, P., VEZINA, L. & GOMORD, V. 2008. Down-regulated expression of plant-specific glycoepitopes in alfalfa. *Plant Biotechnol J*, 6, 702-21.
- STACY, K. M. 2005. Therapeutic MABs: Saving Lives and Making Billions *The Scientist*, 19, 17.
- STADLMANN, J., PABST, M., KOLARICH, D., KUNERT, R. & ALTMANN, F. 2008. Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides. *Proteomics*, 8, 2858-71.
- STATISTICS 2019. Pharmaceutical market: worldwide revenue 2001-2018. 2019.
- STEIN, H., WILENSKY, M., TSAFRIR, Y., ROSENTHAL, M., AMIR, R., AVRAHAM, T., OFIR, K., DGANY, O., YAYON, A. & SHOSEYOV, O. 2009. Production of bioactive, post-translationally modified, heterotrimeric, human recombinant type-I collagen in transgenic tobacco. *Biomacromolecules*, 10, 2640-5.
- STONE, S. L., BRAYBROOK, S. A., PAULA, S. L., KWONG, L. W., MEUSER, J., PELLETIER, J., HSIEH, T. F., FISCHER, R. L., GOLDBERG, R. B. & HARADA, J. J. 2008. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: Implications for somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 3151-6.
- STONE, S. L., KWONG, L. W., YEE, K. M., PELLETIER, J., LEPINIEC, L., FISCHER, R. L., GOLDBERG, R. B. & HARADA, J. J. 2001. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 11806-11811.

- STRASSER, R. 2016. Plant protein glycosylation. *Glycobiology*, 26, 926-939.
- SURPIN, M. & RAIKHEL, N. 2004. Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 100-9.
- SUZUKI, M., KAO, C. Y. & MCCARTY, D. R. 1997. The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity. *Plant Cell*, 9, 799-807.
- SUZUKI, M., WU, S., LI, Q. & MCCARTY, D. R. 2014. Distinct functions of COAR and B3 domains of maize VP1 in induction of ectopic gene expression and plant developmental phenotypes in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 85, 179-191.
- SWANSON, S. J., BETHKE, P. C. & JONES, R. L. 1998. Barley aleurone cells contain two types of vacuoles. Characterization Of lytic organelles by use of fluorescent probes. *The Plant cell*, 10, 685-698.
- TAKEYAMA, N., KIYONO, H. & YUKI, Y. 2015. Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials. *Ther Adv Vaccines*, 3, 139-54.
- TAMURA, K., SHIMADA, T., ONO, E., TANAKA, Y., NAGATANI, A., HIGASHI, S.-I., WATANABE, M., NISHINMURA, M. & AND HARA-NISHIMURA, I. 2003. Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *Plant J*, 35, 545-555.
- TAO, Z., SHEN, L., GU, X., WANG, Y., YU, H. & HE, Y. 2017. Embryonic epigenetic reprogramming by a pioneer transcription factor in plants. *Nature*, 551, 124-128.
- TORRES, E., GONZALEZ-MELENDI, P., STÖGER, E., SHAW, P., TWYMAN, R. M., NICHOLSON, L., VAQUERO, C., FISCHER, R., CHRISTOU, P. & PERRIN, Y. 2001. Native and Artificial Reticuloplasmic Co-Accumulate in Distinct Domains of the Endoplasmic Reticulum and in Post-Endoplasmic Reticulum Compartments. *Plant Physiology*, 127, 1212.
- TSCHOFEN, M., KNOPP, D., HOOD, E. & STÖGER, E. 2016. Plant Molecular Farming: Much More than Medicines. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 9, 271-94.
- TU, B. P. & WEISSMAN, J. S. 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol*, 164, 341-6.
- TUSÉ 2011. Safety of plant-made pharmaceuticals: Product development and regulatory considerations based on case studies of two autologous human cancer vaccines. *Vaccine*, 7, 322-330.
- TUSE, D., TU, T. & MCDONALD, K. A. 2014. Manufacturing economics of plant-made biologics: case studies in therapeutic and industrial enzymes. *Biomed Res Int*, 2014, 256135.
- TWYMAN, R. M., SCHILLBERG, S. & FISCHER, R. 2012. The Production of Vaccines and Therapeutic Antibodies in Plants. 145-159.
- TWYMAN, R. M., STÖGER, E., SCHILLBERG, S., CHRISTOU, P. & FISCHER, R. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol*, 21, 570-8.
- ULLRICH, K. K., HISS, M. & RENSING, S. A. 2015. Means to optimize protein expression in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 61-67.
- VANHERCKE, T., PETRIE JAMES, R., EL TAHCHY, A., SINGH SURINDER, P. A. L. & LIU, Q. 2014. *Processes For Producing Lipids*. US patent application US 201313841641 A. 2014/08/19.
- VASILEV, N., SMALES, C. M., SCHILLBERG, S., FISCHER, R. & SCHIERMEYER, A. 2016. Developments in the production of mucosal antibodies in plants. *Biotechnol Adv*, 34, 77-87.
- VERDIER, J. & THOMPSON, R. D. 2008. Transcriptional regulation of storage protein synthesis during dicotyledon seed filling. *Plant and Cell Physiology*, 49, 1263-1271.
- VEZINA, L. P., FAYE, L., LEROUGE, P., D'AOUST, M. A., MARQUET-BLOUIN, E., BUREL, C., LAVOIE, P. O., BARDOR, M. & GOMORD, V. 2009. Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnol J*, 7, 442-55.
- VIOTTI, C., KRUGER, F., KREBS, M., NEUBERT, C., FINK, F., LUPANGA, U., SCHEURING, D., BOUTTE, Y., FRESCATADA-ROSA, M., WOLFENSTETTER, S., SAUER, N., HILLMER, S., GREBE, M. &

- SCHUMACHER, K. 2013. The endoplasmic reticulum is the main membrane source for biogenesis of the lytic vacuole in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25, 3434-49.
- VITALE, A. & HINZ, G. 2005. Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *Trends Plant Sci*, 10, 316-23.
- VITALE, A. & RAIKHEL, N. 1999. What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends in Plant Science*, 4, 149-155.
- VITALE, A. A. R. N. 1999. What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends in Plant Science*, 4, 149-155.
- VOINNET, O., RIVAS, S., MESTRE, P. & BAULCOMBE, D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J*, 33, 949-56.
- VON LUPKE, A., SCHAUERMANN, G., FEUSSNER, I. & HINZ, G. 2008. Peripheral membrane proteins mediate binding of vacuolar storage proteins to membranes of the secretory pathway of developing pea cotyledons. *J Exp Bot*, 59, 1327-40.
- WALSH, G. 2014. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat Biotechnol*, 32, 992-1000.
- WALSH, G. & JEFFERIS, R. 2006. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol*, 24, 1241-52.
- WALWYN, D. R., HUDDY, S. M. & RYBICKI, E. P. 2015. Techno-economic analysis of horseradish peroxidase production using a transient expression system in *Nicotiana benthamiana*. *Appl Biochem Biotechnol*, 175, 841-54.
- WANG, X., CHUNG, K. P., LIN, W. & JIANG, L. 2017. Protein secretion in plants: conventional and unconventional pathways and new techniques. *Journal of Experimental Botany*, 69, 21-37.
- WEBSTER, D. E. & THOMAS, M. C. 2012. Post-translational modification of plant-made foreign proteins; glycosylation and beyond. *Biotechnol Adv*, 30, 410-8.
- WESTERHOF, L. B., WILBERS, R. H., VAN RAAIJ, D. R., NGUYEN, D. L., GOVERSE, A., HENQUET, M. G., HOKKE, C. H., BOSCH, D., BAKKER, J. & SCHOTS, A. 2014. Monomeric IgA can be produced in planta as efficient as IgG, yet receives different N-glycans. *Plant Biotechnol J*, 12, 1333-42.
- WILLARD, J. J., DREXLER, J. W., DAS, A., ROY, S., SHILO, S., SHOSEYOV, O. & POWELL, H. M. 2013. Plant-derived human collagen scaffolds for skin tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, 19, 1507-18.
- WOJCIKOWSKA, B., JASKOLA, K., GASIOREK, P., MEUS, M., NOWAK, K. & GAJ, M. D. 2013. LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) promotes embryogenic induction in somatic tissues of Arabidopsis, via YUCCA-mediated auxin biosynthesis. *Planta*, 238, 425-40.
- WYCOFF, K., MACLEAN, J., BELLE, A., YU, L., TRAN, Y., ROY, C. & HAYDEN, F. 2015. Anti-infective immunoadhesins from plants. *Plant Biotechnol J*, 13, 1078-93.
- XIANG, L., ETXEBERRIA, E. & VAN DEN ENDE, W. 2013. Vacuolar protein sorting mechanisms in plants. *FEBS J*, 280, 979-93.
- XIAO, S., SHILOACH, J. & BETENBAUGH, M. J. 2014. Engineering cells to improve protein expression. *Current Opinion in Structural Biology*, 26, 32-38.
- XU, J., DOLAN, M. C., MEDRANO, G., CRAMER, C. L. & WEATHERS, P. J. 2012. Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnol Adv*, 30, 1171-84.
- XU, J., TOWLER, M. & WEATHERS, P. J. 2016. Platforms for Plant-Based Protein Production. In: PAVLOV, A. & BLEY, T. (eds.) *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*. Cham: Springer International Publishing.
- YAMAMOTO, M., MARUYAMA, D., ENDO, T. & NISHIKAWA, S. 2008. Arabidopsis thaliana has a set of J proteins in the endoplasmic reticulum that are conserved from yeast to animals and plants. *Plant Cell Physiol*, 49, 1547-62.
- YANG, X., SRIVASTAVA, R., HOWELL, S. H. & BASSHAM, D. C. 2016. Activation of autophagy by unfolded proteins during endoplasmic reticulum stress. *Plant J*, 85, 83-95.

- YAO, J., WENG, Y., DICKEY, A. & WANG, K. Y. 2015. Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges. *Int J Mol Sci*, 16, 28549-65.
- YTTERBERG, A. J. & JENSEN, O. N. 2010. Modification-specific proteomics in plant biology. *J Proteomics*, 73, 2249-66.
- YUEN, C. Y., WONG, K. & CHRISTOPHER, D. A. 2016. Phylogenetic characterization and promoter expression analysis of a novel hybrid protein disulfide isomerase/cargo receptor subfamily unique to plants and chromalveolates. *Mol Genet Genomics*, 291, 455-69.
- YUSIBOV, V., KUSHNIR, N. & STREATFIELD, S. J. 2016. Antibody Production in Plants and Green Algae. *Annu Rev Plant Biol*, 67, 669-701.
- YUSIBOV, V., STREATFIELD, S. J. & KUSHNIR, N. 2011. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond. *Hum Vaccin*, 7, 313-21.
- ZHANG, C., HICKS, G. R. & RAIKHEL, N. V. 2014. Plant vacuole morphology and vacuolar trafficking. *Front Plant Sci*, 5, 476.
- ZHANG, J., YU, H., ZHANG, Y., WANG, Y., LI, M., ZHANG, J., DUAN, L., ZHANG, M. & LI, Z. 2016. Increased abscisic acid levels in transgenic maize overexpressing AtLOS5 mediated root ion fluxes and leaf water status under salt stress. *J Exp Bot*, 67, 1339-55.

Anexo

Material suplementario del capítulo II

1. Efecto de LEC2 sobre reporteros direccionados a vacuolas

Como se indicó en el capítulo II, se analizaron los efectos de LEC2 sobre la acumulación de la proteína vacuolar RFP-AFVY (vac-RFP) observándose aumentos de 3 – 7 veces en presencia de LEC2 (Figura S.1).

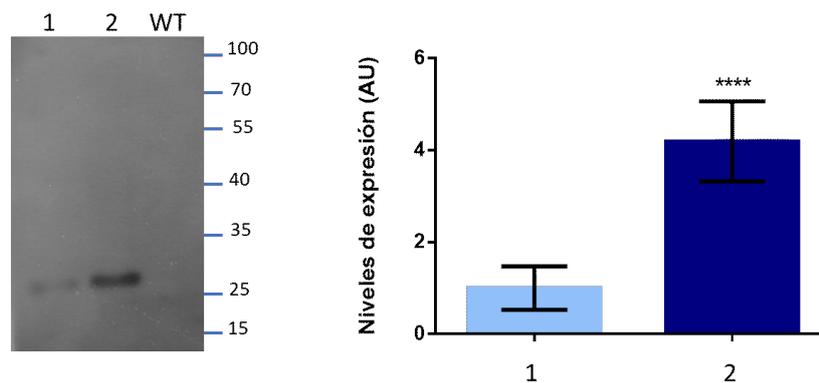


Figura S.1. Efecto del factor de semilla LEC2 sobre la acumulación de proteínas vacuolares.

Los cambios en la acumulación de vac-RFP en presencia y ausencia de LEC2 fueron analizados por inmunoblot empleando un anticuerpo específico contra RFP.

La calle WT corresponde a un extracto de hojas infiltradas con agua, la calle 1 corresponde a extractos de hojas infiltradas con agrobacterias que portaban la construcción P19 y vac-RFP y la calle 2 corresponde a hojas infiltradas con agrobacterias que portaban las construcciones vac-RFP y LEC2.

Para cuantificar el efecto de LEC2 se analizó la intensidad de las bandas obtenidas en el inmunoblot utilizando el software ImageJ. El histograma muestra los valores obtenidos para 3 experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar de la media. Diferencia estadísticamente significativa por test de Tukey: **** $p \leq 0,0001$

2. Efecto de LEC2 sobre la localización de las variantes vacuolares de GFP

Se decidió trabajar con GFP fusionada a dos señales direccionamiento vacuolar bien caracterizadas, KISIA (vac1-GFP) y NIFRGGF (vac2-GFP), provenientes de la proteína de reserva 11S de amaranto, con la finalidad de evaluar si el efecto observado sobre vac-RFP era particular de este marcador o se extendía a proteínas que poseen señales de direccionamiento a vacuola distintas y a su vez, debido a que esta proteína no es estable en el compartimento vacuolar. El análisis de localización subcelular demostró que, en ausencia de LEC2 estas versiones de GFP no son detectadas en el lumen de la vacuola central, probablemente debido a la inestabilidad que presenta esta molécula a pH ácido, lográndose observar marca en el ER en células aisladas, posiblemente debido a moléculas en tránsito (Figura S2, control). En cambio, en presencia de LEC2 ambas variantes vacuolares de GFP se localizaron en el apoplasto (Figura S.2, +LEC2).

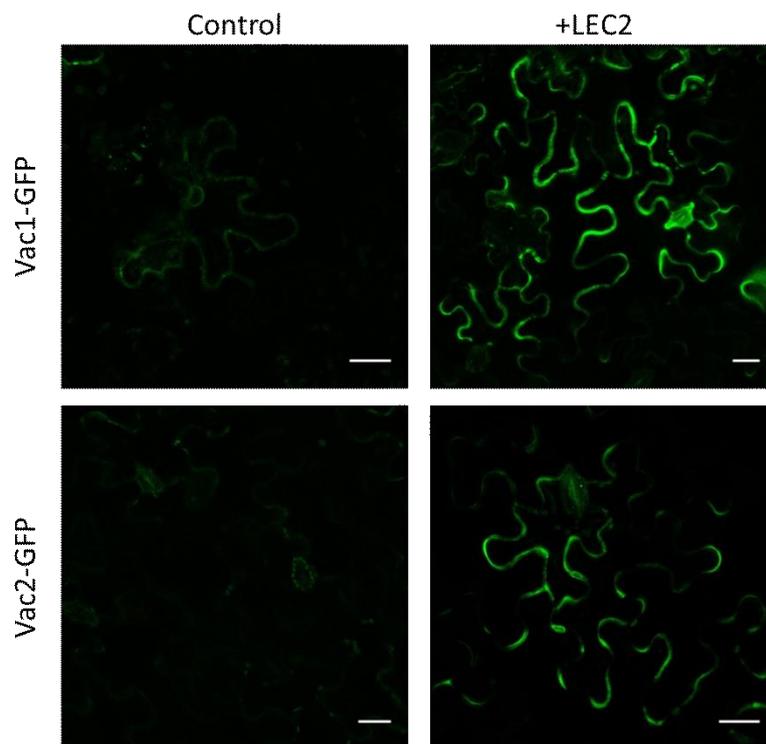


Figura S.2. Efecto de LEC2 sobre la localización de vac1-GFP y vac2-GFP.

Localización subcelular de Vac1-GFP y Vac2-GFP en ausencia (Control) y presencia de LEC2 (+LEC2). En ausencia de LEC2 ambas versiones de GFP fueron observadas en el ER únicamente en células aisladas, mientras que en presencia de LEC2 las mismas se localizaron en el apoplasto. Escala de la barra 25 μ m.

3. Curva de calibración *in vitro* del sensor apo-pHusion

Para relacionar la relación de fluorescencia entre eGFP y mRFP1 con un valor de pH se realizó, para cada ensayo, una curva de calibración utilizando fluido apoplastico extraído de plantas apo-pHusion el cual se calibro a diferentes pH utilizando el set de *buffers* indicados en Materiales y Métodos. La figura S.3 muestra la curva de calibración obtenida para las micrografías de relación de fluorescencia presentadas en el capítulo II.

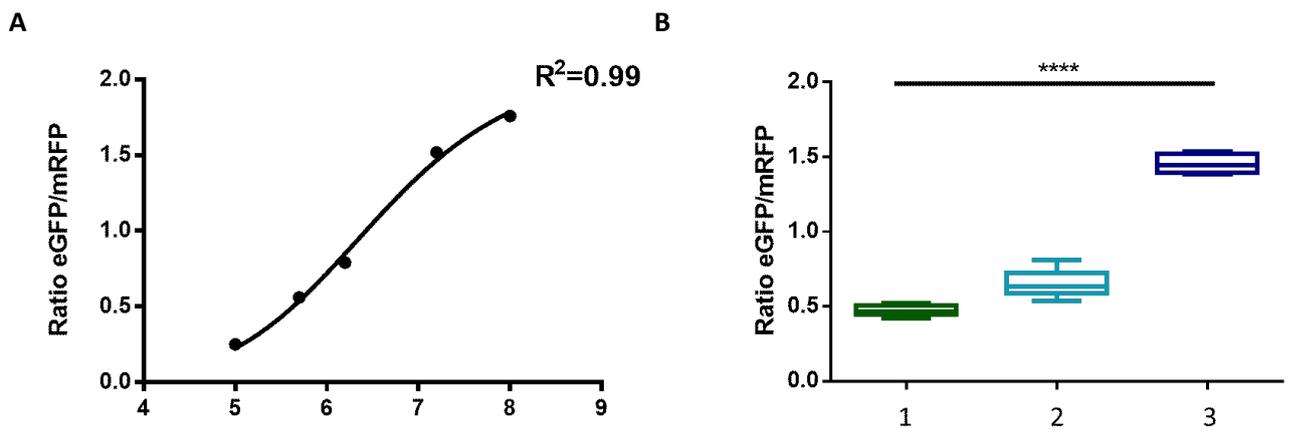


Figura S.3. Calibración del sensor apo-pHusion.

A) Curva de calibración *in vitro* del sensor Apo-pHusion.

B) Gráfico de relación de fluorescencia de plantas apo-pHusion sin infiltrar (1), infiltradas con el vector vacío (2) y con LEC2 (3). Las barras representan error estándar de la media. **** Denota diferencia estadísticamente significativa por test de Tukey ($p \leq 0.0001$).