



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“Evaluación de sistemas de expresión heterólogos para la
producción de factores de crecimiento humanos
recombinantes”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Carolina Müller

Directora: Dra. María Eugenia Segretin

Directora Adjunta: Dra. Sonia Alejandra Wirth

Consejera de estudios: Dra. Rita Ulloa

Lugar de trabajo:
Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular
(INGEBI-CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires

15 de Julio de 2024

“Evaluación de sistemas de expresión heterólogos para la producción de factores de crecimiento humanos recombinantes”

Los factores de crecimiento son proteínas claves para el mantenimiento de cultivos de células madre *in vitro*, ya que regulan la proliferación y diferenciación celular. Dada la importancia de las células madre y su potencial aplicación en terapias regenerativas, resulta de especial interés desarrollar plataformas de expresión que permitan una producción segura y a bajo costo de factores de crecimiento recombinantes. El uso de plantas como biorreactores constituye un sistema atractivo para la producción de proteínas recombinantes, debido a su capacidad para alcanzar niveles potencialmente altos de expresión, los mínimos requerimientos para su crecimiento y el fácil escalado. Por otro lado, la expresión en levaduras se destaca como un sistema de producción rápido y costo-efectivo, con un gran potencial para la producción de proteínas de origen eucariota.

En el marco de esta Tesis doctoral, ensayamos distintos sistemas de expresión para producir factores de crecimiento recombinantes, evaluando la expresión en la levadura *Pichia pastoris* y dos sistemas de plantas como biorreactores: la transformación del genoma plastídico de *Nicotiana tabacum* y la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. Evaluamos la producción del Factor de Crecimiento Fibroblástico básico humano (hFGFb) en los tres sistemas mencionados, y de la Proteína Morfogénica Ósea humana (hBMP4) específicamente en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.

Se ensayaron distintas condiciones de crecimiento e inducción para la producción de rhFGFb y rhBMP4 en cultivos de la levadura *P. pastoris*. Sin embargo, no fue posible producir las proteínas de interés bajo las condiciones analizadas, y se enfocó el estudio al análisis de los distintos biorreactores vegetales.

A través de la transformación del genoma plastídico se obtuvieron plantas transplastómicas que, a pesar de exhibir alteraciones fenotípicas, expresaron de forma estable la proteína rhFGFb, alcanzando niveles de expresión de 0,3% de la proteína total soluble (PTS). Se logró purificar rhFGFb biológicamente activo a partir de las plantas transplastómicas, corroborando su actividad biológica en un ensayo de proliferación celular. Por otro lado, se evaluó la expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* y se estudió la acumulación de la proteína rhFGFb en distintos compartimentos subcelulares. El apoplasto, la vacuola y el retículo endoplasmático resultaron compartimentos subcelulares adecuados para la acumulación de la proteína recombinante.

De los sistemas estudiados, la transformación del genoma plastídico se presenta como el más prometedor, permitiendo producir rhFGFb biológicamente activo en grado de pureza y

cantidad suficientes para su potencial aplicación en cultivos de células madre. En conjunto, estos resultados demuestran el potencial de los biorreactores vegetales para la expresión de factores de crecimiento recombinantes.

Palabras clave: factores de crecimiento, biorreactores vegetales, expresión transitoria, plantas transplastómicas, cloroplastos, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, células madre.

“Evaluation of heterologous expression systems for the production of recombinant human growth factors”

Growth factors are crucial proteins for maintaining stem cell cultures *in vitro*, regulating both cell proliferation and differentiation. Given the relevance of stem cells and their potential applications in regenerative therapies, it is of special interest to develop expression platforms that enable the safe and cost-effective production of recombinant growth factors. The use of plants as bioreactors represents an attractive system for the production of recombinant proteins, due to their ability to achieve potentially high expression levels, their minimal growth requirements and scalability. On the other hand, yeast expression stands out as a rapid and cost-effective production system with great potential to produce eukaryotic-derived proteins.

In this doctoral Thesis, we studied different platforms to produce recombinant growth factors, evaluating the expression in the yeast *Pichia pastoris* and two plant bioreactor systems: plastid genome transformation of *Nicotiana tabacum* and transient expression in *Nicotiana benthamiana*. We evaluated the production of human basic Fibroblast Growth Factor (hFGFb) in the three aforementioned systems. Additionally, we assessed the production of human Bone Morphogenetic Protein (hBMP4) specifically in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.

Different growth and induction conditions were tested for the production of rhFGFb and rhBMP4 in *P. pastoris* cultures. However, it was not possible to produce the proteins of interest under the analyzed conditions. Therefore, we focused our study on the analysis of plant-based bioreactors.

Through plastid genome transformation, we obtained transplastomic plants which, despite exhibiting phenotypic alterations, stably expressed the rhFGFb protein and reached expression levels of 0.3% of the total soluble protein (TSP). Biologically active rhFGFb was purified from the transplastomic plants, confirming its biological activity in a cell proliferation assay. On the other hand, we evaluated rhFGFb transient expression in *N. benthamiana* plants, and studied the accumulation of the recombinant protein in different subcellular compartments. The apoplast, vacuole, and endoplasmic reticulum were suitable subcellular compartments for the accumulation of the rhFGFb.

Among the studied systems, plastid genome transformation was the most promising system for rhFGFb production, allowing the production of biologically active rhFGFb in sufficient purity and quantity for its potential application in stem cell cultures. Overall, these results underscore the potential of plant bioreactors for the expression of recombinant growth factors.

Key words: growth factors, plant-based bioreactors, transient expression, transplastomic plants, chloroplasts, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, mammalian stem cells.

*Dedicada a mi abuela Susana, mi primera maestra,
por despertar en mi la pasión por aprender, y ser siempre mi guía.*

Agradecimientos

Quiero agradecer a todos los que me acompañaron y formaron parte de este proceso.

A mis directoras, Euge y Sonia, por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto. A Euge, por su guía y enseñanza, por su paciencia para mis preguntas, por ayudarme a adaptarme a los cambios que vinieron y su comprensión en los momentos difíciles. A Sonia, por guiarme en mis primeros pasos científicos con firmeza y seguridad. A ambas por enseñarme a hacer ciencia y darme espacio para crecer y explorar.

A la FCEN, por ser un gran pilar en toda mi formación académica y profesional. Al grupo de Enzimas Industriales de AGBT (Lucy, Mechi, Flor, Maribel y Leo) por ser mis primeros compañeros de ruta. A Carolina Perez Castro y Nicolás Budnik, por sus valiosos aportes a este trabajo. Y a Nicolás Blanco, por acompañarme en el camino fotosintético.

Al INGEBI, un gran lugar para trabajar, aprender y compartir. A todos los plantólogos y al 201 extendido (Ceci, Sofi, Denise, Ana, Lu, Diego, Mari, Franco, Fran, Noe y Nati) con quien compartimos años de charlas, frustraciones, risas y tortas. A Noe, por todos los cafés, consejos y su paciencia para los mil mensajes. A Nati, por compartir su conocimiento y ser mi gurú de la estadística. A Fran Ro, por transmitirme su paz mental. A Marina, por cuidar siempre muy bien de las plantitas, y por las charlas del almuerzo.

Gracias al FBA 201, los viejos y los nuevos (Fer, Euge, Vero, Mauro, Mauricio, Fede Alfano, Fede Mirkin, Marce, Cata, Mora, Iván y Juanelo). A Fer, por abrirme las puertas de este hermoso laboratorio y estar siempre disponible para brindar su apoyo. A Fede Mirkin, por inspirarme confianza y entender el lado divertido de mi seriedad. A Vero, por las charlas motivacionales que siempre me dan un empujoncito, y a Mauro por animar las tardes con sus discusiones. A Marce, por las crisis tesísticas compartidas y el aliento para seguir. A Juanelo, el cebador oficial y compañero de equipo kinesiológico. A Mora, por su alegría y por haberme prestado un rato su mano derecha. A Cata, mi consejera de tesis, por ser mi compañera de alegrías y tristezas de *westerns*, por los labos nocturnos y las largas charlas sobre la ciencia y la vida. Y a todos los que me compartieron su fuerza y sus manos, para poder llegar hasta acá, con un brazo nuevo y tomando mate.

Gracias a mi familia que estuvo siempre para acompañarme. En especial a mis papás, por su apoyo constante, por creer en mí e impulsarme a seguir mis metas, y por darme fuerza para sortear obstáculos y volverme a levantar. A mi Bobe, mis tías y mis primos, por su apoyo y buenas energías. A Sebi, por compartir conmigo las charlas científicas, y los consejos sabios de hermano mayor. A Lali por sus mensajes y charlas de aliento. A Edith, por brindarme esa cuota de positividad y decisión necesarias.

A mis amigas de la vida (Flor, Caro, Meli y Andre), por todos los años que me aguantaron cancelar planes y hablar de la tesis. A Juli C. por ser mi diseñadora personalizada. A mis amigas científicas; a Dani, por darme ánimos y ayudarme a encontrar la perspectiva, y a Juli por ser mi gran compañera del trayecto final.

Y un agradecimiento especial a Dami, mi compañero, esposo y asistente psicológico oficial de esta tesis. Gracias por ser mi sostén, por estar siempre al lado mío, por respetar mi concentración y festejar cada resultado como si fuera un gol (aunque no entiendas de qué hablo). Gracias a vos y Oli, el compañero perruno, que me acompañaron firmes en mis días de escritura. Gracias a todos los que me alentaron a seguir este camino por recordarme que, al final, hay recompensa.

Índice

Resumen.....	1
Abstract	3
Agradecimientos.....	5
Índice.....	7
Publicaciones y Financiamiento.....	12
Introducción.....	13
1. Sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes	14
2. Expresión de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica <i>Pichia pastoris</i>.....	17
3. Los biorreactores vegetales representan una alternativa atractiva respecto a los sistemas convencionales.....	18
3.1. <i>Sistemas de expresión en plantas</i>	20
3.2 <i>La transformación del genoma plastídico tiene el potencial de alcanzar altos niveles de expresión de proteínas heterólogas</i>	22
3.2.1 <i>Características del genoma plastídico</i>	22
3.2.2 <i>La transformación del genoma plastídico</i>	23
3.2.3 <i>El potencial de la transformación del genoma plastídico para la producción de proteínas recombinantes</i>	25
3.2.4 <i>La expresión de transgenes en cloroplastos puede ocasionar efectos pleiotrópicos</i>	26
3.3 <i>Expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i></i>	27
3.4 <i>Estrategias para mejorar la acumulación de proteínas recombinantes y optimizar su purificación</i>	29
4. Producción de factores de crecimiento recombinantes.....	31
Hipótesis y objetivos.....	35
Resultados.....	36
<u>Capítulo 1: Expresión de rhFGFb en plantas transplastómicas de <i>Nicotiana tabacum</i>...</u>	37
1. Obtención de las líneas transplastómicas UTR-FGF	38
2. Las líneas UTR-FGF 3 y 4 son homoplásticas	41
3. Las líneas transplastómicas UTR-FGF acumulan la proteína rhFGFb.....	42

4. La proteína rhFGFb puede purificarse a partir de hojas de plantas transplastómicas	44
4.1 Desarrollo de un protocolo de purificación por cromatografía de afinidad	44
4.2 Purificación de rhFGFb a partir de hojas de plantas transplastómicas	48
5. La proteína rhFGFb purificada induce la proliferación de células HEK293	51
6. Evaluación de los efectos pleiotrópicos asociados a la expresión de rhFGFb	52
6.1. Las líneas UTR-FGF muestran un marcado retraso en su crecimiento	53
6.2 La expresión de rhFGFb tiene un impacto negativo en el desempeño fotosintético de las líneas UTR-FGF	55
6.3 Efecto de la intensidad lumínica sobre el fenotipo clorótico de las líneas UTR-FGF	60
Capítulo 2: Expresión transitoria en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	63
1. Diseño de un sistema de clonado modular para el direccionamiento de proteínas heterólogas a distintos compartimentos subcelulares	64
2. Las señales de localización subcelular incorporadas en el pEAQ-Golden direccionaron a las proteínas de fusión a los compartimentos esperados	68
3. El apoplasto, el retículo endoplasmático y la vacuola son compartimentos adecuados para expresar rhFGFb	70
4. La expresión transitoria de rhFGFb dió como resultado bajos niveles de acumulación	72
5. Análisis bioinformático de la secuencia de rhFGFb	74
5.1 Verificación de la optimización de codones de la secuencia codificante hFGFb	74
5.2 Análisis de sitios de poliadenilación alternativos en <i>N. benthamiana</i>	75
Capítulo 3: Expresión de factores de crecimiento recombinantes en <i>Pichia pastoris</i>	79
1. Construcción de los vectores de expresión pPIC_FGFb y pPICK_BMP4	80
2. Transformación de <i>P. pastoris</i> GS115 y selección de los clones recombinantes	84
3. Ensayos de expresión de rhFGFb y rhBMP4	86
Discusión	91
1. Expresión de rhFGFb en biorreactores vegetales	92
2. Expresión de factores de crecimiento recombinantes en <i>Pichia pastoris</i>	98
Conclusión general	100

Materiales y Métodos.....	101
1. Cepas bacterianas.....	102
1.1. <i>Escherichia coli</i>.....	102
1.1.1. Condiciones de cultivo	102
1.1.2. Preparación de células electro-competentes de <i>E. coli</i>	102
1.1.3. Transformación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	102
1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	103
1.2.1. Condiciones de cultivo.	103
1.2.2. Preparación de células electrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i>	103
1.2.3. Transformación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	103
2. Líneas de plantas	104
3. Plásmidos.....	104
4. Secuencias.....	105
4.1 <i>Proteínas expresadas</i>	105
4.2. Señales de direccionamiento subcelular	107
5. Oligonucleótidos iniciadores.....	109
6. Metodología del ADN recombinante	110
6.1. <i>Purificación de ADN plasmídico</i>.....	110
6.1.1. Método de lisis alcalina	110
6.1.2. Purificación mediante columnas comerciales.....	111
6.2. <i>Preparación de plásmidos e insertos para el clonado molecular</i>	111
6.2.1. Amplificación de insertos por PCR	111
6.2.2. Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	111
6.2.3. Desfosforilación de extremos compatibles	111
6.2.4. Fosforilación de productos de PCR	111
6.2.5. Rellenado de extremos 5' protruyentes	112
6.2.6. Purificación de plásmidos digeridos y fragmentos de ADN.....	112
6.2.7. Cuantificación del ADN	112
6.3 <i>Reacciones de ligación</i>	112
6.4 <i>Reacciones de Golden Gate Assembly</i>	113
7. Transformación genética de plantas	113
7.1. <i>Transformación del genoma plasmídico</i>.....	113
7.1.1 Preparación de micropartículas de oro	113

7.1.2. Recubrimiento de las partículas de oro con ADN plasmídico	113
7.1.3. Bombardeo de micropartículas	114
7.1.4. Rusticación	115
7.1.5 Esterilización y germinación in vitro de plantas de <i>N. tabacum</i>	115
7.2 Agroinfiltración con <i>A. tumefaciens</i>	115
8. Análisis de ADN	116
8.1. Extracción de ADN total de plantas para análisis por PCR	116
8.2. Purificación de ADN total para análisis por Southern blot	116
8.3. Evaluación de la integración del transgen por PCR	117
8.4 Southern blot	117
8.4.1. Digestión del ADN	117
8.4.2. Electroforesis y transferencia a membrana de Nylon	117
8.4.3. Hibridación, detección y revelado	118
8.4.4. Preparación y marcación de la sonda.....	119
9. Análisis de proteínas	119
9.1. Extracción de proteínas de plantas	119
9.1.1. Extracción de proteínas solubles	119
9.1.2. Extracción de proteínas totales de plantas transplastómicas.....	119
9.1.3. Purificación de rhFGFb por Cromatografía de Afinidad con Metal Inmovilizado (IMAC).....	120
9.1.4. Cuantificación de proteínas solubles totales	120
9.1.5 Cuantificación de rhFGFb	121
9.2. Electroforesis de proteínas	121
9.2.1. Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes (SDS-PAGE).....	121
9.2.2. Tinción de proteínas totales con <i>Coomassie brilliant blue</i>	121
9.2.3. <i>Western blot</i>	121
10. Evaluación de la actividad biológica de rhFGFb	122
10.1. Cultivo de células HEK293T	122
10.2. Ensayo de proliferación	122
11. Medición de parámetros fotosintéticos	123
12. Cuantificación de clorofila	123
12.1. Cuantificación de Unidades SPAD	123
12.2. Medición de clorofila total	123
13. Análisis de localización subcelular por microscopía confocal	124

14. Sistema de expresión de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i>	124
14.1. Cepas y condiciones de cultivo	124
14.2 Preparación de células electrocompetentes de <i>P. pastoris</i>	124
14.3 Transformación genética de <i>P. pastoris</i>	125
14.3.1 Linealización del ADN plasmídico.....	125
14.3.2 Transformación por electroporación	125
14.4 Análisis de ADN genómico de <i>P. pastoris</i>	125
14.4.1 Colony PCR para <i>P. pastoris</i>	125
14.5. Producción de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i>	126
14.5.1. Fase de Proliferación	126
14.5.2. Fase de Inducción	126
Anexo	127
Obtención del vector pEAQ-Golden	128
1. Adaptación del vector pEAQ-HT para el clonado por Golden Gate Assembly	128
1.1 Introducción de mutaciones sinónimas dentro del gen <i>P19</i>	128
1.2 Clonado de secuencia polylinker con sitios <i>BsaI</i>	131
2. Diseño de las señales de localización subcelular	132
3. Clonado de las proteínas fluorescentes y rhFGFb fusionadas a las distintas señales	133
3.1. Clonado de proteínas fluorescentes	133
3.2. Clonado de hFGFb	133
3.3. Chequeo in silico del sitio de corte para la peptidasa de la señal	134
Bibliografía	136

Publicaciones y Financiamiento

Los resultados de esta Tesis han sido publicados en el siguiente trabajo:

-Production of biologically active human basic Fibroblast Growth Factor (hFGFb) using *Nicotiana tabacum* transplastomic plants. Müller, Carolina; Budnik, Nicolás; Mirkin, Federico Gabriel; Vater, Catalina Francisca; Bravo-Almonacid, Fernando Félix; Perez-Castro, Carolina; Wirth, Sonia Alejandra, Segretin, María Eugenia. *Planta* 260, 28 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00425-024-04456-5>.

La realización de esta Tesis fue posible gracias a las siguientes fuentes de financiamiento:

-Beca inicial de doctorado PICT Start up 2014-3700.

-Beca interna de Finalización de Doctorado (CONICET)

-PICT Start up 2014-3700 “Producción de factores de crecimiento y citoquinas recombinantes para su utilización en cultivos de células de mamífero con propiedades de célula madre”. IR: Dra. Sonia A Wirth

-Proyecto PIP 11220200103102CO. “Comprender aspectos claves del desarrollo y el desempeño fotosintético que permitan optimizar la expresión de proteínas en cloroplastos”. Director: Dra. María Eugenia Segretin

Introducción

1. Sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes

La producción de proteínas recombinantes a partir de organismos genéticamente modificados constituye uno de los principales aportes de la biotecnología moderna, permitiendo la obtención de proteínas biológicamente activas para diversas aplicaciones industriales y medicinales (Puetz y Wurm, 2019; Sanchez-Garcia et al., 2016). La insulina humana recombinante fue el primer biofármaco producido en *Escherichia coli* y aprobado para su comercialización (Goeddel et al., 1979). Desde entonces, se han realizado numerosos estudios para el desarrollo y la optimización de sistemas de producción de proteínas heterólogas.

E. coli es el organismo más utilizado para la producción industrial de proteínas heterólogas, por ser un sistema bien establecido para el cual se disponen de numerosas herramientas biotecnológicas disponibles (Huang et al., 2012; Rosano et al., 2019). Los costos asociados a este sistema de producción son bajos, gracias a la rápida tasa de crecimiento que permite obtener cultivos bacterianos con alta densidad utilizando medios simples (Rosano and Ceccarelli, 2014). A su vez, su manipulación genética es rápida y sencilla, con una gran variedad de vectores de expresión disponibles que incluyen distintos promotores (inducibles y fuertes), marcadores de selección y elementos regulatorios (Amroffell et al., 2023; Sandomenico et al., 2020; Schuster y Reisch, 2022).

A pesar de sus ventajas, este sistema posee algunas limitaciones, especialmente para la producción de proteínas recombinantes con fines terapéuticos. La expresión en *E. coli* conlleva el riesgo de contaminación del producto final con endotoxinas bacterianas, principalmente lipopolisacáridos (LPS), que presentan una alta inmunogenicidad en humanos (Mamat et al., 2015). En consecuencia, la producción de biofármacos recombinantes en *E. coli* requiere de una purificación exhaustiva, aumentando los costos de producción (Wilding et al., 2019).

Por otro lado, *E. coli* carece de la maquinaria molecular para introducir modificaciones post-traduccionales características de organismos eucariotas, tales como la glicosilación. Si bien se han modificado genéticamente cepas de *E. coli* para expresar glicosiltransferasas, en éstas la glicosilación de proteínas resultó incompleta o heterogénea (Chen, 2012; Harding y Feldman, 2019). Además, el ambiente reductor del citoplasma bacteriano representa un impedimento para la correcta formación de puentes disulfuro (Berkmen, 2012). Esto puede afectar el plegamiento y la solubilidad de las proteínas heterólogas, promoviendo su agregación en cuerpos de inclusión (Bhatwa et al., 2021).

El sistema más utilizado para producir glicoproteínas a escala industrial es el cultivo de células de mamífero, principalmente el cultivo de células CHO (células derivadas del ovario de hámster) (Lalonde y Durocher, 2017; W.-J. Xu et al., 2023). Este sistema permite obtener

glicoproteínas recombinantes con un patrón de *N*-glicosilación propio de mamíferos y prácticamente idéntico al de proteínas humanas (Khan et al., 2017). La conservación del patrón de *N*-glicosilación contribuye a la producción de una proteína biológicamente activa y de reducida inmunogenicidad, a la vez que favorece su plegamiento y estabilidad (Wang et al., 2015). Como contrapartida, la producción en células de mamífero conlleva altos costos de mantenimiento y escalado, y presenta un potencial riesgo de contaminación con virus y otros agentes patogénicos para humanos (Chiang et al., 2019).

La búsqueda de sistemas heterólogos para la producción de proteínas recombinantes humanas resulta un campo en constante desarrollo, para el establecimiento de sistemas que permitan una producción segura y costo-efectiva. Además de los antes mencionados, existen una amplia variedad organismos huésped para la expresión de proteínas heterólogas, que incluyen levaduras (Baghban et al., 2019; Sinclair y Choy, 2002), células de insecto (Contreras-Gómez et al., 2014; Zhang et al., 2018) y distintas especies vegetales (Giddings, 2001; Lee et al., 2023; Park et al., 2021). En la tabla 1 se presenta un análisis comparativo de los distintos sistemas.

El sistema óptimo dependerá de la naturaleza de la proteína a expresar, así como de su potencial aplicación, debiendo considerarse sus características estructurales, la localización subcelular y las modificaciones post-traduccionales (Schütz et al., 2023).

Sistema	Procariota	Eucariota			
	Bacterias	Levaduras	Células de insecto	Células de mamífero	Biorreactores vegetales
Tiempo de producción	Corto ^{1,2}	Corto ¹	Corto ²	Largo ¹	Largo (expresión estable) ³ Corto (expresión transitoria) ³
Costo de producción	Bajo ¹	Bajo ¹	Medio ²	Alto ¹	Bajo ⁴
Glicosilación	Ausente o incompleta ⁵	Proteoglicanos con alta proporción de manosa ^{5,6}	Proteoglicanos simples ⁷	Proteoglicanos complejos ⁷	Patrón de glicosilación específico de plantas (transformación nuclear) ⁷
Riesgo de contaminación	Presencia de endotoxinas ¹	Muy bajo ⁸	Bajo ⁴	Virus patógenos y priones ¹	Muy bajo ⁵

Tabla 1: Análisis comparativo de distintos sistemas de producción de proteínas recombinantes. Esta tabla fue elaborada a partir de información obtenida de: Karbalaie et al., 2020¹, Felberbaum, 2015², Xu et al., 2012³, Fischer y Buyel, 2020⁴, Harding y Feldman, 2019⁵, Thak et al., 2018⁶, Khan et al., 2017⁷, Baghban et al., 2019⁸.

2. Expresión de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*

Las levaduras como sistema de expresión combinan las ventajas de los fermentadores bacterianos con la posibilidad de introducir modificaciones post-traduccionales propias de organismos eucariotas. Este sistema permite una producción rápida a bajos costos, debido a su fácil manipulación genética y a sus altas tasas de crecimiento. A su vez, estos sistemas presentan un bajo riesgo de contaminación con patógenos humanos y se consideran seguros al no producir endotoxinas inmunogénicas (Schütz et al., 2023; Tsuda y Nonaka, 2024).

La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (recientemente renombrada *Komagataella phaffii*) es una de las especies más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico e industrial (Baghban et al., 2019; Ergün et al., 2021). Su principal ventaja radica en la posibilidad de alcanzar grandes cantidades de biomasa en medios simples, utilizando metanol como fuente de carbono (Tsuda y Nonaka, 2024). Debido a que *P. pastoris* secreta un número bajo de proteínas endógenas, direccionar la proteína recombinante hacia la vía secretoria resulta ventajoso, al permitir obtener altas concentraciones de la proteína heteróloga en el sobrenadante del cultivo. La baja proporción de proteínas endógenas secretadas facilita la purificación de la proteína de interés (Yang y Zhang, 2018). Para su secreción, la proteína heteróloga debe fusionarse a una señal de secreción *N*-terminal, tal como el péptido señal proveniente del factor alfa (*matting type*) de *Saccharomyces cerevisiae* (Lin-Cereghino et al., 2013).

Existen diversas herramientas genéticas y tipos de promotores (constitutivos e inducibles) para la expresión de genes heterólogos en *P. pastoris*, así como cepas que permiten optimizar el cultivo y la producción (Looser et al., 2015; Yang y Zhang, 2018). Uno de los promotores inducibles más utilizado es el promotor del gen *AOX1* (alcohol oxidasa I) que codifica para una enzima involucrada en el primer paso de la asimilación de metanol. El promotor *PAOX1* permite la expresión de altos niveles de proteínas recombinantes. Su expresión se encuentra finamente regulada, siendo inducida por metanol y reprimida por otras fuentes de carbono como la glucosa, glicerol y etanol (Vogl y Glieder, 2013).

Como organismos eucariotas unicelulares, las levaduras cuentan con la maquinaria para la *N*-glicosilación, la formación de puentes disulfuro y el procesamiento proteolítico (Shrivastava et al., 2023). Cabe destacar que la *N*-glicosilación en levaduras

difiere de la producida en células de mamíferos y humanos, presentando una mayor proporción de manosa (Khan et al., 2017). A su vez, el patrón de *N*-glicosilación varía también entre distintas especies de levaduras; en comparación con el patrón de glicosilación de *S. cerevisiae*, los proteoglicanos en *P. pastoris* poseen cadenas de manosa más cortas y no incorporan residuos antigénicos como la 1,3-manosa (Thak et al., 2018). Por otro lado, *P. pastoris* es un microorganismo considerado seguro (GRAS), al no ser patológico (Yang y Zhang, 2018). En conjunto, estas características convierten a *P. pastoris* en un sistema prometedor para la producción de proteínas con potenciales fines terapéuticos (Karbalaee et al., 2020).

Hasta la fecha, se han expresado de forma exitosa hasta 5000 proteínas recombinantes de uso biofarmacéutico e industrial utilizando *P. pastoris* como sistema de expresión (Tsuda y Nonaka, 2024; Yang y Zhang, 2018). Algunos ejemplos de proteínas de uso terapéutico son: péptidos antimicrobianos (Kuddus et al., 2016; Li et al., 2019), la proinsulina (Baeshen et al., 2015), interleuquinas (Dagar et al., 2022; Liu et al., 2013; Y. Xu et al., 2023) y factores de crecimiento (Eissazadeh et al., 2017; Song et al., 2016). En cuanto a la producción de enzimas de uso industrial, pueden encontrarse proteínas con variadas aplicaciones, desde fitasas para la avicultura (Yang et al., 2015), amilasas para la degradación del almidón (Parashar y Satyanarayana, 2017) y enzimas para la producción de biocombustibles (Shin et al., 2015).

3. Los biorreactores vegetales representan una alternativa atractiva respecto a los sistemas convencionales

El uso de plantas como biorreactores constituye una alternativa que supera varias limitaciones de los sistemas tradicionales de expresión en *E. coli* y células de mamífero (Shanmugaraj et al., 2020). Esta tecnología se basa en la utilización de plantas o cultivos de células vegetales modificados genéticamente para la producción de una proteína recombinante de interés. Los primeros ejemplos del uso de biorreactores vegetales incluyen la producción de un anticuerpo en plantas de tabaco (Hiatt et al., 1989), la seroalbúmina humana en células de tabaco en suspensión (Sijmons et al., 1990) y avidina en plantas de maíz (Kusnadi et al., 1998).

La utilización de plantas como biorreactores permite la producción de proteínas recombinantes a gran escala y a un bajo costo, especialmente cuando se utilizan sistemas preestablecidos de cosecha y procesamiento de biomasa vegetal (Shanmugaraj et al., 2020; Twyman et al., 2003). Gracias a la naturaleza autotrófica de

las plantas, es posible obtener grandes cantidades de biomasa utilizando agua y energía lumínica, contribuyendo a reducir los costos de producción (Eidenberger et al., 2023). Asimismo, el escalado puede realizarse de forma sencilla y rápida mediante el incremento de la superficie de siembra (Schillberg et al., 2019). El riesgo de contaminación con virus animales y endotoxinas bacterianas se reduce considerablemente en comparación con los métodos basados en fermentadores procariotas o cultivos de células de mamífero (Buyel, 2019; Clark y Maselko, 2020). Una ventaja adicional de este sistema es la posibilidad de almacenar la proteína recombinante en granos u órganos de almacenamiento; esto permite independizarse de la necesidad de mantener la cadena de frío para la estabilidad de la proteína recombinante (Chung et al., 2022). Por otro lado, la expresión en plantas permite el ensamblado de complejos multiméricos y proteínas intrínsecamente desordenadas (Gengenbach et al., 2018).

Las plantas poseen la maquinaria molecular de síntesis, secreción y procesamiento de proteínas propias de células eucariotas, pudiendo producir proteínas con estructura conservada y un correcto plegamiento (Twyman et al., 2003; Wang et al., 2018). Cabe mencionar, que el patrón de glicosilación en plantas difiere con el de mamíferos, incorporando glicanos específicos que podrían resultar inmunogénicos o afectar la actividad biológica de la proteína (Gomord et al., 2010; Khan et al., 2017). Se han explorado distintas estrategias de ingeniería genética para modificar los patrones de *N*-glicosilación en plantas, o para evitar la incorporación de glicosilaciones reteniendo la proteína en el retículo endoplasmático, siempre y cuando la glicosilación no sea indispensable para la funcionalidad de la proteína recombinante (Kommineni et al., 2019; Schoberer y Strasser, 2017). En comparación con la producción en células de mamífero, la producción en biorreactores vegetales resulta un sistema de expresión más seguro y sustentable, gracias a que la biomasa vegetal remanente y subproductos de la purificación pueden ser biodegradados o reutilizados (Buyel, 2019). De esta manera, se reduce la cantidad de residuos biológicos y los gastos asociados a su manipulación. Por otro lado, los biorreactores vegetales cumplen con las demandas actuales de productos libres de uso de animales y cuentan con mayor aceptación pública respecto del uso de animales transgénicos (Schillberg et al., 2019).

Hoy en día se han producido una enorme variedad de proteínas recombinantes en biorreactores vegetales, incluyendo hormonas, citoquinas, antígenos para la fabricación de vacunas y anticuerpos, y muchos de estos desarrollos fueron aprobados para su comercialización (revisado en Eidenberger et al., 2023). Como ejemplos de

biofármacos que han llegado al mercado encontramos a las enzimas Glucocerebrosidasa y Pegunigalsidasa alfa producidas mediante un sistema de expresión en cultivo de células de zanahoria (Protalix Biotherapeutics). Otro ejemplo exitoso de proteínas producidas en plantas que han llegado al mercado son las proteínas de uso industrial avidina y β -glucuronidasa producidas en maíz transgénico y comercializadas por la compañía Merck.

3.1. Sistemas de expresión en plantas

Se han desarrollado una gran variedad de sistemas de expresión que pueden adaptarse al tipo de proteína a expresar, otorgando versatilidad a la producción en biorreactores vegetales. En cuanto al tipo de transformación genética, los biorreactores vegetales pueden clasificarse en sistemas integrativos (transformación estable) o sistemas no integrativos (expresión transitoria). A su vez, existen dos principales metodologías para la generación de plantas transgénicas: la transformación del genoma nuclear y la transformación del genoma plastídico. En la figura 1 se muestran las ventajas y desventajas de los distintos tipos de transformación.

En la transformación estable, el transgen se integra en el genoma de la planta y se hereda a la progenie. Si bien la generación de líneas transgénicas trae asociados tiempos largos, una vez establecida la línea transgénica es posible escalar de forma rápida la producción. La transformación del genoma nuclear es el método más ampliamente difundido para la generación de cultivos genéticamente modificados (Burnett y Burnett, 2020). En este tipo de transformación, la integración del transgen ocurre al azar dentro del genoma y en consecuencia, puede ser integrado en una zona transcripcionalmente inactiva (De Neve et al., 1999; Müller, 2010; Volkov et al., 2006). Asimismo, el transgen puede integrarse en múltiples copias o existir rearreglos genéticos que pueden desencadenar mecanismos de silenciamiento génico, limitando la expresión del transgen (Svitashev et al., 2002). En conjunto, estos factores redundan en una expresión variable del transgen, que dependerá de su sitio de integración y no puede determinarse de antemano. Como consecuencia, luego de la transformación genética se deben evaluar numerosos eventos de transformación (o líneas independientes) para seleccionar las mejores líneas transgénicas.

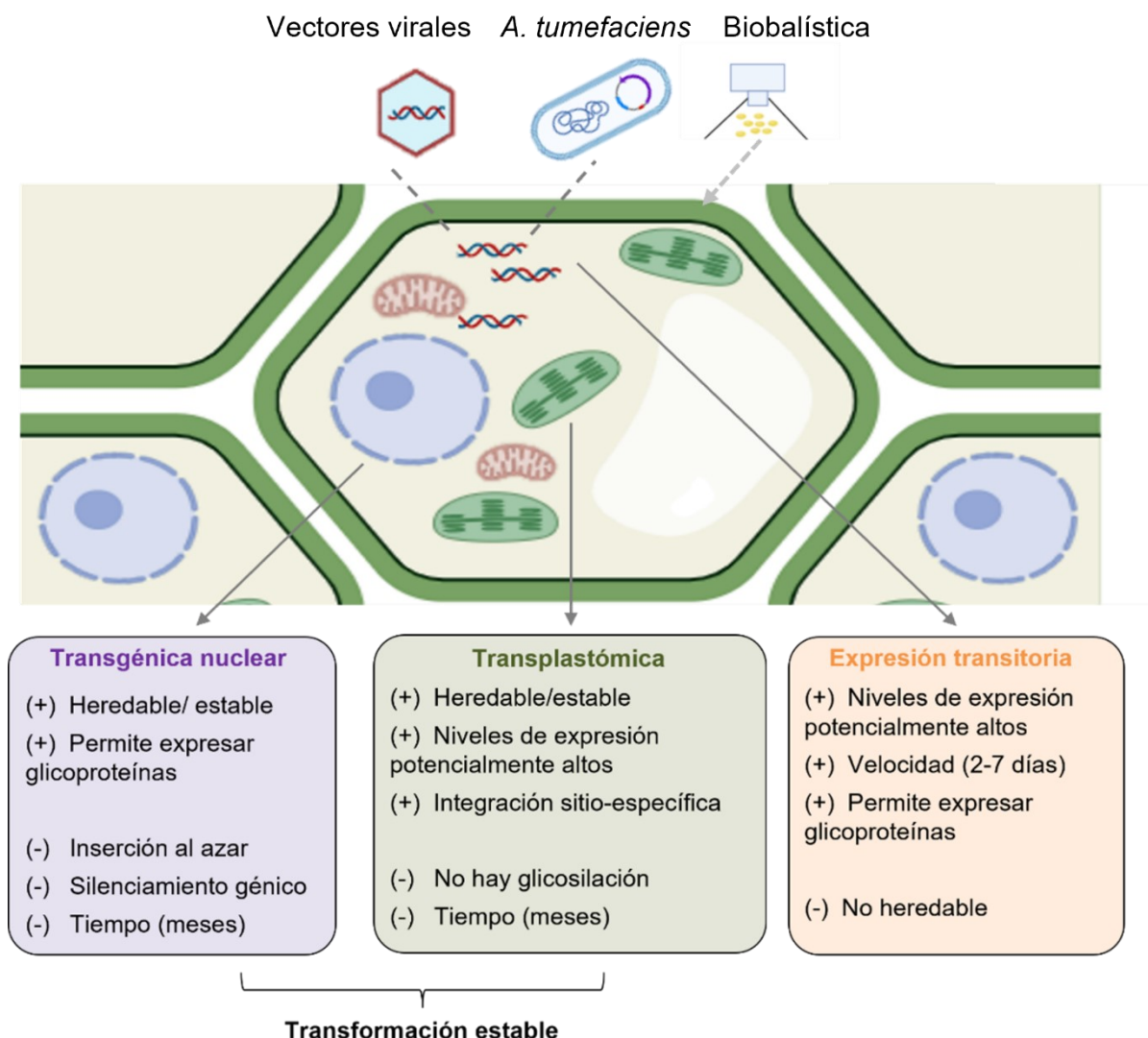


Figura 1. Clasificación de biorreactores según el tipo de transformación. Se detallan las ventajas (+) y desventajas (-) de cada tipo de transformación. Figura creada con Biorender.

La transformación del genoma plástido es un método especialmente atractivo para la producción de proteínas recombinantes ya que permite alcanzar niveles de expresión potencialmente altos, como se amplía en la *sección 3.2*. Este sistema comparte con la transformación nuclear las características positivas de la transformación estable, sin los efectos de silenciamiento génico asociados a la inserción al azar del transgen.

Por otro lado, la expresión transitoria constituye una metodología rápida y versátil con el potencial de alcanzar altos niveles de acumulación de proteínas recombinantes a tiempos cortos, utilizando vectores biológicos para la introducción del material genético, como vectores virales y *Agrobacterium tumefaciens* (Lee et al., 2023; Sainsbury, 2020).

En la sección 3.3 se detalla el sistema de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* por agroinfiltración.

3.2 La transformación del genoma plastídico tiene el potencial de alcanzar altos niveles de expresión de proteínas heterólogas

3.2.1 Características del genoma plastídico

Los cloroplastos se originaron evolutivamente a partir de un evento de endosimbiosis de un microorganismo procariota fotosintético por parte de un protista heterotrófico (Sibbald y Archibald, 2020). Por esta razón, esta organela posee un genoma circular y maquinaria transcripcional con características propias de microorganismos procariotas. A lo largo de la evolución, el genoma del endosimbionte se redujo mediante la pérdida de genes no esenciales o su transferencia al genoma nuclear, dando lugar a plastomas de entre 100 a 250 genes (Bock, 2015).

La estructura del plastoma está conservado entre las distintas especies de plantas vasculares y comprende una región larga de genes de copia simple (LSC) y una región corta de genes de copia simple (SSC), separadas por dos regiones repetidas invertidas (IR). Las regiones IR son idénticas entre sí y varían en cuanto a su orientación (Daniell et al., 2016). Gracias a las tecnologías de secuenciación modernas fue posible secuenciar el plastoma de distintas especies, siendo el plastoma de *Nicotiana tabacum* el primero secuenciado (figura 2).

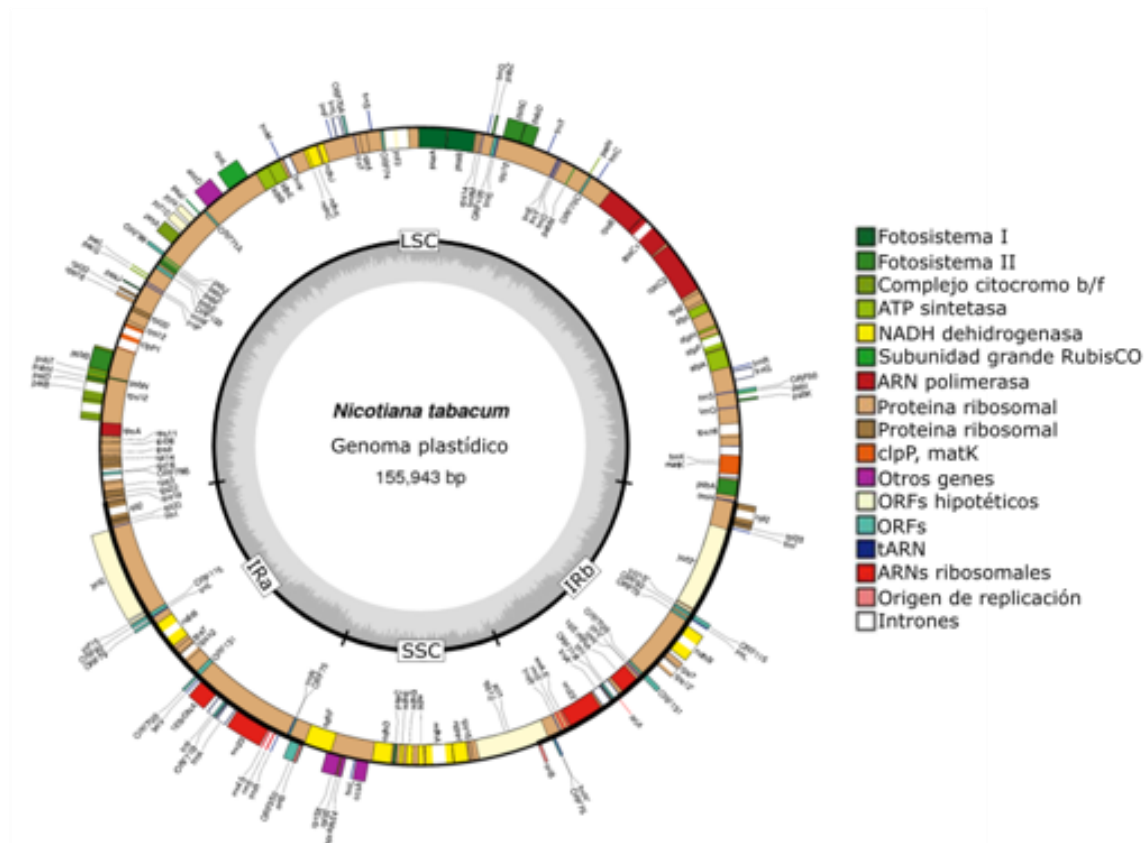


Figura 2. Esquema del genoma plastídico de *Nicotiana tabacum*. IRa, IRb: regiones repetidas invertidas. LSC, SSC: regiones de genes copia simple larga y corta, respectivamente. Tomado de Daniell et al., 2016.

3.2.2 La transformación del genoma plastídico

La técnica de biobalística es el método mayormente empleado para la transformación del genoma plastídico. Esta técnica consiste en la aceleración de micropartículas de oro o tungsteno recubiertas con ADN correspondiente al vector de transformación, mediante la aplicación de una presión externa (usualmente obtenida a través de la acumulación de un gas inerte como el helio a alta presión) (figura 3A). Las micropartículas impactarán el tejido vegetal, y allí se liberará el ADN que podrá integrarse por distintos mecanismos en los diferentes genomas presentes en la célula vegetal. A través de la técnica de biobalística, es posible co-transformar con más de un vector de transformación. Más aún, cuando se utilizan partículas de oro recubiertas con un vector de transformación plastídica y un vector de transformación nuclear, es posible transformar en simultáneo ambos genomas (Elghabi et al., 2011).

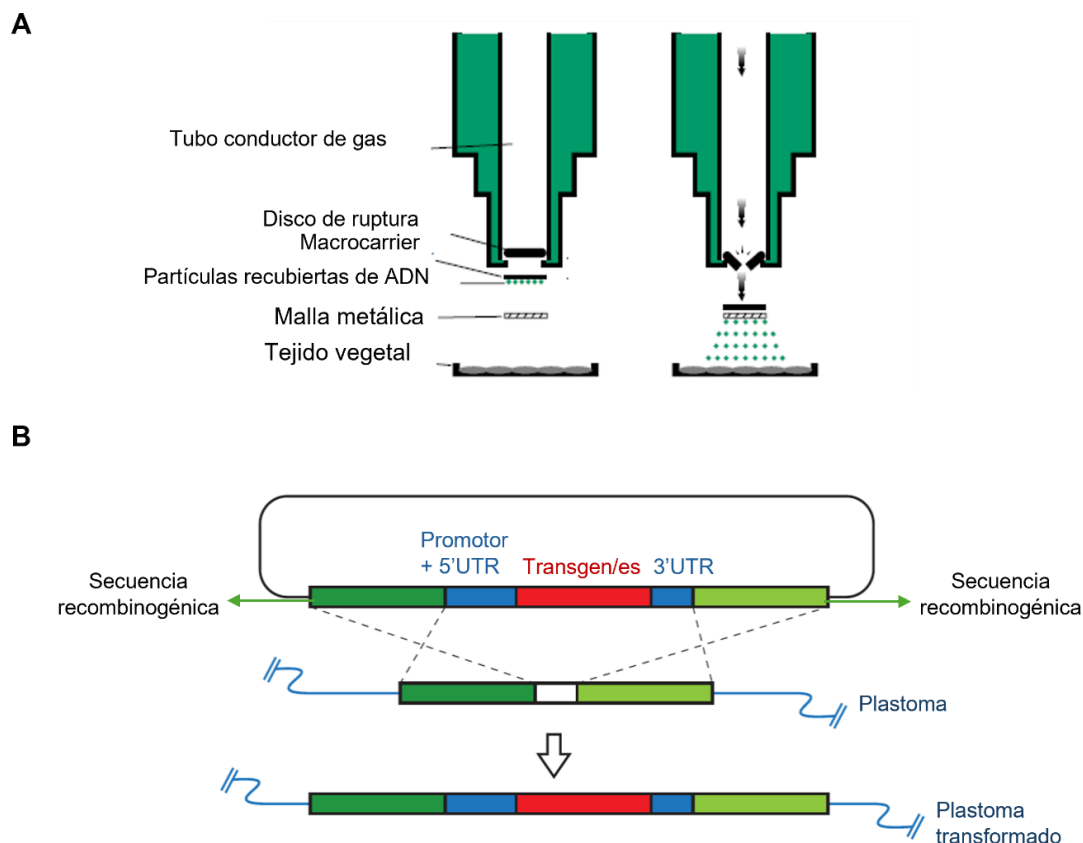


Figura 3. Transformación del genoma plastídico. (A) Método de biobalística. Figura obtenida del manual de Biorad EG Bulletin 1688. (B) Esquema simplificado de un vector para transformación del genoma plastídico, y de su integración al mismo por recombinación homóloga. Adaptado de Day y Goldschmidt-Clermont, 2011.

Una vez que el ADN plasmídico ingresa a la célula, el transgen se integra al genoma por recombinación homóloga (Bock, 2021; Maliga, 2004). Para que ocurra la recombinación, los vectores de transformación plastídica deben poseer secuencias con homología al plastoma, denominadas secuencias recombinogénicas, flanqueando al transgen y al gen selector (figura 3B) (Jin y Daniell, 2015). De esta manera, es posible dirigir la integración de la construcción genética a sitios del plastoma que no interfieran con genes importantes para la fisiología vegetal y que sean transcripcionalmente activos.

Cada cloroplasto posee múltiples copias del genoma pastídico, fenómeno conocido como poliploidía (An et al., 2022). Luego de la transformación genética sólo algunas copias del genoma plastídico incorporan el transgen, dando lugar a células que poseen copias del plastoma transformadas y no transformadas, fenómeno conocido como heteroplastía (Day y Goldschmidt-Clermont, 2011; Maliga, 2004). Para evitar la pérdida del transgen y obtener líneas transplastómicas estables, es necesario obtener

plantas en las cuales todas las copias del genoma plastídico estén transformadas, denominadas plantas homoplásticas. La homoplastía se favorece luego de sucesivas rondas de regeneración en presencia de agente selector, o bien a partir del pasaje por semilla (Bock, 2001; Maliga y Bock, 2011; Rozov et al., 2023).

3.2.3 El potencial de la transformación del genoma plastídico para la producción de proteínas recombinantes

Las plantas transplastómicas resultan un sistema de especial interés para la producción de proteínas recombinantes. La posibilidad de insertar genes en un sitio específico del plastoma y la ausencia de silenciamiento génico reportado en cloroplastos permiten evitar los efectos de posición asociados a la transformación nuclear (Bock, 2015; Scotti et al., 2013). Estas características, en conjunto con la poliploidía de los cloroplastos, dan como resultado un nivel potencialmente alto de expresión y acumulación de proteínas recombinantes. Este sistema cuenta con una ventaja adicional en cuanto a su bioseguridad ya que en la mayoría de las especies estudiadas los cloroplastos son de herencia materna, lo que evita el flujo génico de transgenes a través del polen (Lal et al., 2020).

Un ejemplo que ilustra el potencial de este sistema fue la expresión de la proteína VP1-GUS (Lentz et al., 2010), en un trabajo previo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal (INGEBI). En dicho estudio se expresó un epítipo del virus de la fiebre aftosa (VP1) fusionado a la enzima β -glucuronidasa (GUS) en plantas transplastómicas de tabaco, obteniendo niveles de expresión de hasta 51% de la proteína total soluble (PTS). Por otro lado, un estudio reciente demostró la factibilidad de expresar y acumular hasta un 75,6 % PTS de la enzima β -glucosidasa en plantas transplastómicas de tabaco (Castiglia et al., 2016).

Una particularidad del sistema de expresión plastídica, es la posibilidad de expresar policistrones (An et al., 2022). Esto resulta especialmente beneficioso en el campo de la ingeniería metabólica, al facilitar la expresión de distintas proteínas dentro de una vía metabólica o proteínas que forman complejos como las cadenas pesada y liviana de anticuerpos (Jensen y Scharff, 2019). Un ejemplo exitoso fue la expresión de tres genes involucrados en la vía de síntesis de tococromanol (vitamina E) en plantas transplastómicas de tabaco y de tomate (Lu et al., 2013).

Debido a su origen evolutivo, los cloroplastos no cuentan con la maquinaria post-traducciona para la introducción de glicosilaciones (Feng et al., 2022). Esto debe tenerse en cuenta a la hora de expresar proteínas recombinantes de origen eucariota. A su vez, el entorno redox de esta organela podría no resultar óptimo para la formación de puentes disulfuro, pudiendo afectar la solubilidad de proteínas recombinantes que los requieran para su correcto plegamiento (Wirth et al., 2006). No obstante, existen evidencias de la expresión de proteínas recombinantes con puentes disulfuro tanto en el estroma como en el tilacoide de cloroplastos (Bally et al., 2008; Morgenfeld et al., 2020).

La cantidad de especies que han sido transformadas a nivel del genoma plastídico resulta más acotado que para la transformación nuclear, limitándose principalmente a especies dicotiledóneas (An et al., 2022). *N. tabacum* es la especie mayormente utilizada para la transformación del genoma plastídico debido a su fácil manipulación genética y a la disponibilidad de vectores y protocolos bien establecidos de cultivo *in vitro* para la transformación. Asimismo, el cultivo *N. tabacum* en invernaderos permite alcanzar grandes cantidades de biomasa (Burnett y Burnett, 2020; Xu et al., 2012). Al ser un cultivo no comestible, el empleo de *N. tabacum* para producir proteínas recombinantes reduce el riesgo de una introducción accidental del cultivo a las cadenas de producción de alimentos (Davies, 2010; Xu et al., 2012). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta especie posee alcaloides que deberían ser eliminados en el caso de la producción de proteínas de uso biofarmacéutico.

3.2.4 La expresión de transgenes en cloroplastos puede ocasionar efectos pleiotrópicos

El cloroplasto es una organela esencial que se encuentra involucrada en procesos claves para la fisiología vegetal, tales como la fotosíntesis, la fijación de nitrógeno y la biosíntesis de distintas macromoléculas (ácidos grasos, almidón y hormonas). El control del desarrollo de esta organela, así como la regulación de la síntesis de proteínas plastídicas resultan esenciales para el crecimiento vegetativo y el desarrollo de las plantas (Cackett et al., 2022). Por otro lado, distintos compuestos y proteínas sintetizados en el cloroplasto forman parte de una vía de señalización retrógrada, capaz de regular la expresión de genes nucleares. Esta comunicación cloroplasto-núcleo resulta crucial para coordinar distintas respuestas fisiológicas de la planta al medio ambiente (Chan et al., 2016).

La transformación genética del genoma plastídico puede dar lugar a efectos pleiotrópicos no deseados que incluyen una disminución en los pigmentos fotosintéticos, retraso del crecimiento, retraso en la floración e infertilidad masculina (Ruiz y Daniell, 2005; Scotti y Cardi, 2014; Waheed et al., 2011). Estos efectos pleiotrópicos pueden estar asociados a la expresión de la proteína heteróloga o a las secuencias genéticas insertadas (Kuroda y Maliga, 2002; Lössl et al., 2003; Scotti y Cardi, 2014). Además, se sabe que la heteroplastia y los rearrreglos genéticos están asociados a alteraciones morfológicas y fenotípicas en plantas transplastómicas (Ahlert et al., 2003; Rogalski et al., 2008).

En numerosos reportes, la aparición de fenotipos alterados se asocia directamente con los niveles de expresión de la proteína recombinante. Un ejemplo de esto es la expresión de altos niveles (18% PTS) de una proteína viral A27L que produjo fenotipos de retraso en el crecimiento y clorosis en plantas de tabaco (Rigano et al., 2009). Sin embargo, existen reportes de plantas transplastómicas que acumulan altos niveles de proteínas recombinantes sin alteraciones evidentes en el fenotipo, como es el caso de la proteína VP-GUS expresada por nuestro equipo de trabajo (Lentz et al., 2010). Bally y colaboradores realizaron un estudio proteómico en plantas transplastómicas con fenotipos normales que expresaban niveles de 30% y 40% PTS de las proteínas recombinantes HPDP (4-hidroxifenil-piruvato-deshidrogenasa) y GFP (proteína fluorescente verde), respectivamente. Las plantas transplastómicas mostraron una disminución en la expresión de la proteína Rubisco (subunidad mayor y menor) y de proteínas del ciclo de Calvin codificadas a nivel nuclear. Esto sugiere que las plantas son capaces de ajustar las condiciones metabólicas para redirigir recursos energéticos a la expresión de las proteínas heterólogas sin ver afectada su capacidad de fijación de CO₂ (Bally et al., 2011, 2009). En base a estas evidencias, puede decirse que los efectos pleiotrópicos dependen de la naturaleza de la proteína heteróloga, pero no necesariamente de sus niveles de acumulación. Por consiguiente, la aparición de fenotipos alterados en plantas transplastómicas no puede predecirse de antemano y debe evaluarse para cada proteína en particular.

3.3 Expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*

Una de las metodologías más utilizadas es la agroinfiltración en la especie *Nicotiana benthamiana*. El mismo consiste en introducir al espacio intersticial de las hojas mediante presión con una jeringa o por infiltración al vacío, una suspensión de A.

tumefaciens portando en el ADN-T el gen de interés (Marillonnet et al., 2005; Sainsbury, 2020).

Luego de la infiltración, y al cabo de 48hs (o incluso 36hs) se puede detectar la presencia de la proteína recombinante en el tejido infiltrado (figura 4). De esta manera, es posible expresar y purificar una proteína recombinante en términos de semanas, desde el clonado del transgen hasta la transformación genética de la planta.

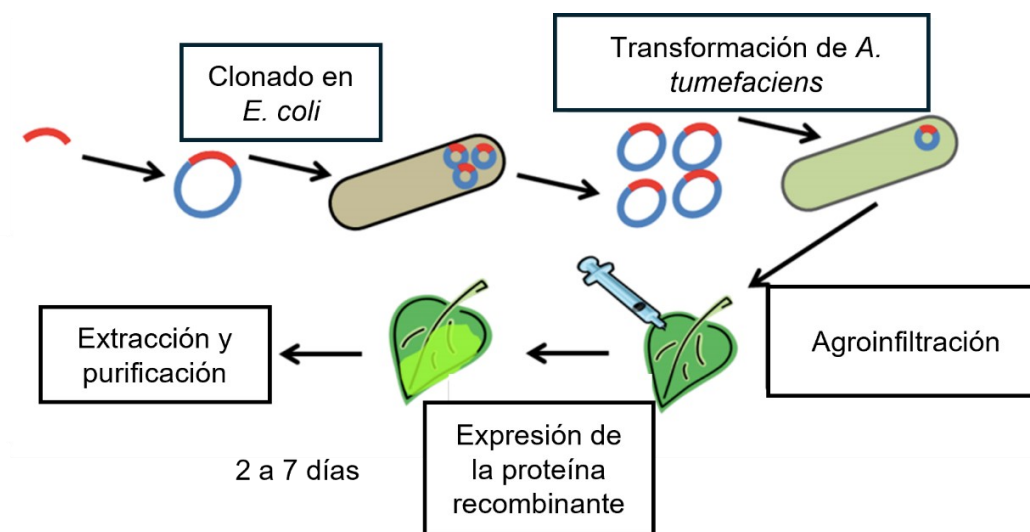


Figura 4. Representación esquemática del protocolo de agroinfiltración. Adaptado de Peyret y Lommonosoff 2013.

En la búsqueda de alcanzar altos niveles de expresión se han optimizado vectores binarios, por ejemplo incluyendo en el ADN-T genes para la síntesis de proteínas supresoras del silenciamiento de origen viral, y distintos elementos regulatorios heterólogos, entre otras estrategias (Peyret et al., 2019; Peyret y Lomonosoff, 2013; Sainsbury y Lomonosoff, 2008).

La especie *N. benthamiana* es la más utilizada para la expresión transitoria ya que es un sistema bien establecido y permite realizar la agroinfiltración sin daño significativo en el tejido foliar (Goodin et al., 2008). La variedad de *N. benthamiana* que posee una mutación en el gen *Rdr1*, que codifica para la una RNA polimerasa RNA dependiente, posee una mayor susceptibilidad a infecciones virales, y es por consiguiente un huésped atractivo para la expresión transitoria (Pombo et al., 2020). A su vez, esta especie se puede cultivar en grandes cantidades en condiciones de

invernadero con costos relativamente bajos, convirtiéndola en un huésped adecuado para la producción de proteínas recombinantes (Sheludko et al., 2007).

El sistema de expresión transitoria permite producir biofármacos de forma rápida para dar respuesta a demandas de enfermedades emergentes (Kopertekh y Schiemann, 2019). Un ejemplo de esto fue la producción de anticuerpos monoclonales para el tratamiento del Ébola (Mapp Biopharmaceutical Inc.) o la producción de vacunas contra SARS-CoV-2 (Medicago Inc.). A su vez, diversos estudios mostraron la factibilidad de utilizar el sistema de expresión transitoria para producir factores de crecimiento recombinantes biológicamente activos, como por ejemplo el hr-aFGF (Ha et al., 2017) y TGF β (Soni et al., 2022; Wilbers et al., 2016). Asimismo, las empresas Leaf expression systems e iBio Inc. (Inglaterra), emplean el sistema de expresión transitoria en *N. benthamiana* para producir y comercializar factores de crecimiento y citoquinas recombinantes como reactivos de laboratorio.

3.4 Estrategias para mejorar la acumulación de proteínas recombinantes y optimizar su purificación

La purificación de una proteína recombinante es un paso clave que afecta en gran medida los costos asociados a su producción. Al utilizar biorreactores vegetales, es necesario obtener la proteína recombinante a partir del tejido vegetal, eliminando los restos celulares, así como otras proteínas vegetales y metabolitos secundarios, aumentando los costos de producción (Schillberg et al., 2019). Existen diversas estrategias para optimizar la purificación, que incluyen el direccionamiento a distintos compartimentos subcelulares u órganos de almacenamiento, la rizosecreción y la utilización de etiquetas de purificación. En la figura 5 se muestra un esquema de los distintos compartimentos a los cuales puede dirigirse la acumulación de la proteína recombinante.

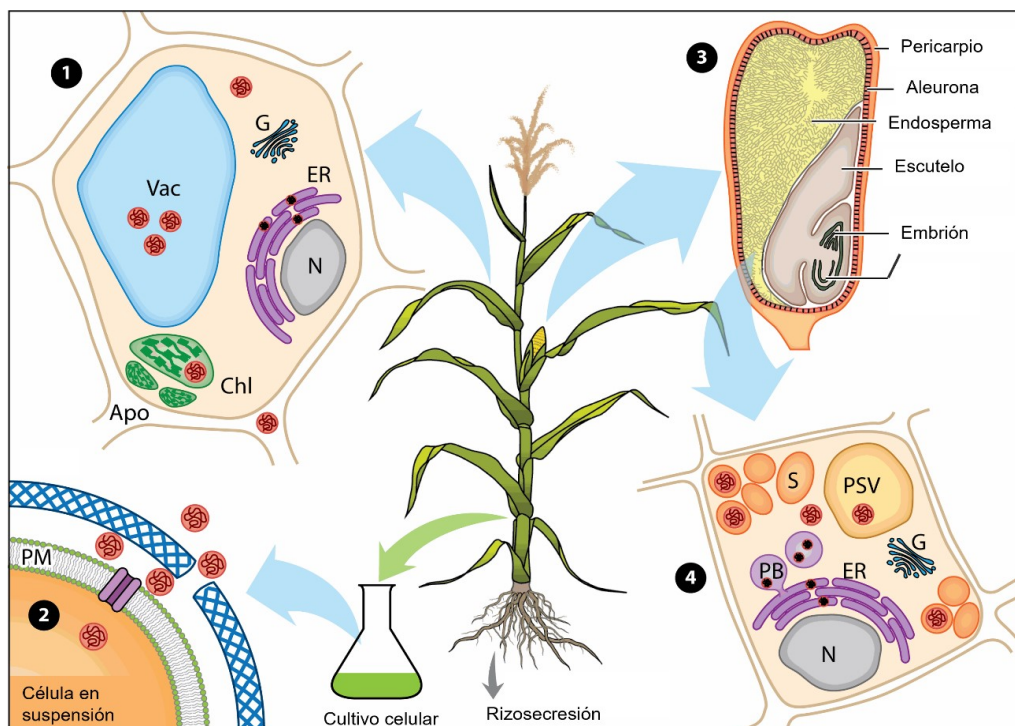


Figura 5. Direccionamiento de proteínas a distintos órganos y compartimentos subcelulares. Tomado de Tschofen et al., 2016. **1:** Célula vegetativa; **2:** Célula en suspensión; **3:** Semilla; **4:** Célula del endosperma; **Apo:** Apoplasto; **ER:** Retículo endoplasmático; **N:** núcleo. **Chl:** cloroplasto; **G:** Aparato de Golgi; **PSV:** Vacuola de almacenamiento; **PB:** Cuerpos proteicos; **S:** Gránulos de almidón.

Las características propias de cada compartimento subcelular pueden afectar la estabilidad de una proteína recombinante, sus modificaciones post-traduccionales, su plegamiento, y su posterior purificación. Por esta razón, el direccionamiento de la acumulación de proteínas recombinantes a distintos compartimentos subcelulares constituye una estrategia para aumentar el rendimiento de un sistema de expresión.

La fusión de la proteína recombinante a un péptido señal *N*-terminal permite la secreción de la proteína recombinante al espacio apoplástico y a través de las raíces al medio circundante (rizosecreción). Al trabajar con células vegetales en suspensión, la secreción al apoplasto facilita la purificación de la proteína recombinante (Tschofen et al., 2016). Es de especial interés direccionar la proteína recombinante a la vía secretoria de semillas (mediante un promotor tejido-específico), ya que esto permite almacenar la proteína recombinante en una matriz protectora dentro de la semilla (Hood et al., 2012).

Por otro lado, existen evidencias de que la incorporación de una señal de retención en retículo endoplasmático resulta en una mayor estabilidad y acumulación de

proteínas recombinantes (Nausch et al., 2012). En este entorno se favorece el correcto plegamiento proteico, debido a la presencia de chaperonas y al ambiente oxidante que promueve la formación de puentes disulfuro. Por otro lado, se demostró que la acumulación de ciertas proteínas recombinantes aumenta al ser direccionadas a la vacuola central, en comparación con el citoplasma y el apoplasto (Ocampo et al., 2016).

4. Producción de factores de crecimiento recombinantes

Los factores de crecimiento son una familia de proteínas de señalización paracrinas que desempeñan diversas funciones clave en el desarrollo de mamíferos (Goldfarb, 1996; Mohammedi et al., 2005). Estas proteínas son de gran relevancia para el área de ciencias biomédicas debido a su rol en la reparación de tejidos (Ren et al., 2019) y su aplicación en el mantenimiento de células madre embrionarias (ESCs, por su sigla en inglés) (Lee et al., 2012).

Las ESCs son células pluripotentes que derivan de la masa celular interna del blastocisto embrionario (figura 6A) (Reubinoff et al., 2000). El cultivo *in vitro* de ESCs permite obtener células que conservan su capacidad de autoperpetuación y diferenciación a distintos tipos celulares (Nishikawa et al., 2007) y resulta una herramienta clave para el estudio de diversas enfermedades así como el desarrollo de terapias regenerativas (Doğan, 2018; Liu et al., 2013). Al día de hoy, existen diversos ensayos clínicos que emplean células madre para medicina regenerativa (Jackson et al., 2017). Una aplicación más reciente del cultivo de células madre de mamíferos es el desarrollo de carne cultivada o agricultura celular (Venkatesan et al., 2022).

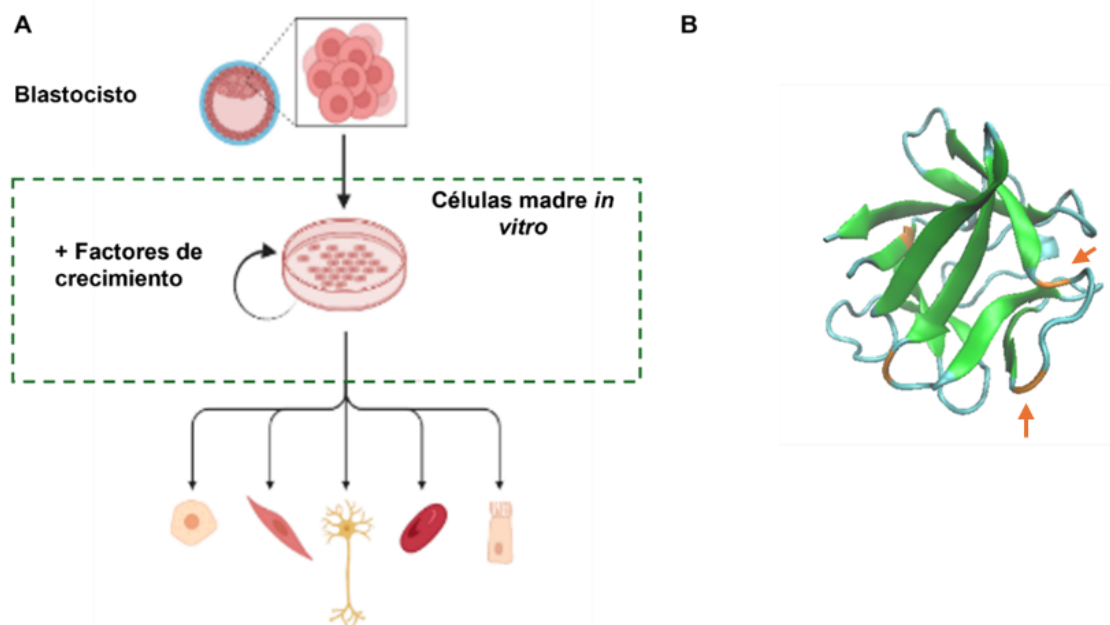


Figura 6. Rol de los Factores de Crecimiento en cultivo celular. (A) Representación esquemática del cultivo de células madre. Figura armada con Biorender. (B) Estructura tridimensional de la proteína FGFb (PDB ID: 4FGF). Se muestra en verde el *core* formado por láminas β . Las flechas naranjas indican los residuos de cisteínas que forman puentes disulfuro intercatenarios.

Para el mantenimiento de cultivos de células madre *in vitro* es fundamental contar con factores de crecimiento recombinantes, implicados en la activación y regulación de la división y diferenciación celular (Mossahebi-Mohammadi et al., 2020). En particular, el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb) resulta esencial para el mantenimiento del estado indiferenciado de las ESCs, siendo la proteína mayormente utilizada para el cultivo *in vitro* (Eiselleova et al., 2009; Levenstein et al., 2006). FGFb regula distintos procesos celulares claves para el desarrollo en mamíferos como la proliferación, diferenciación y migración celular (Bikfalvi et al., 1997). Además, es un potente estimulador de la angiogénesis (Friesel y Maciag, 1995) y cumple un rol importante en la reparación de heridas (Ortega et al., 1998).

En cuanto a su estructura proteica, FGFb es una proteína de 18 kDa que no se encuentra glicosilada, y posee dos cisteínas capaces de formar puentes disulfuro intercatenarios (figura 6B). La formación de puentes disulfuro cumple un rol en la estabilización de estructuras homodiméricas involucradas en el mecanismo de secreción de FGFb en células de mamíferos (Lolicato et al., 2023). FGFb ejerce su función biológica a través de su unión a los receptores tipo tirosina-quinasa FGFR (Hui et al., 2018) y a heparán-sulfato-proteoglicanos (HSPGs) (Garcia et al., 2019). Además, posee

un bolsillo hidrofóbico que le permite la interacción con el fosfolípido de membrana fosfatidil-inositol (Temmerman et al., 2008).

Para la regulación de la diferenciación celular de hESCs, se requiere la incorporación adicional de otros factores de crecimiento. Entre ellos, se destaca la Proteína Morfogenética Ósea 4 (BMP4), que regula la diferenciación a células de linaje ectodérmico y trofoblástico (Hiller et al., 2011).

Dado que el requerimiento de factores de crecimiento supone altos costos para el establecimiento de cultivos celulares y sus aplicaciones (Venkatesan et al., 2022), el estudio de sistemas de producción de factores de crecimiento recombinantes es un campo en constante expansión. En los últimos años se han desarrollado alternativas a los sistemas tradicionales de *E. coli* y células de mamífero para producir factores de crecimiento. La proteína hFGFb se ha expresado de forma exitosa en células de insecto (Masuda et al., 2018), levaduras (Mu et al., 2008) y biorreactores vegetales (Macauyag et al., 2022; Poudel et al., 2019; Soni et al., 2022). La empresa ORF genetics comercializa las proteínas recombinantes FGFb bovina y porcina producidas en semillas de cebada, para su uso en el mantenimiento de cultivos celulares *in vitro*.

Hasta la fecha, los factores de crecimiento recombinantes comercializados en Argentina provienen de empresas extranjeras, y son extremadamente costosos, además de las demoras asociadas con su importación. Por esta razón, establecer una producción local de estas proteínas recombinantes les permitiría a los grupos de investigación que las requieren disponer de un producto en tiempos apropiados y a menor costo.

En el presente trabajo nos propusimos evaluar distintos sistemas de expresión para la producción de factores de crecimiento humanos recombinantes. Enfocamos el estudio a la expresión del factor de crecimiento fibroblástico básico (hFGFb), por su relevancia para el cultivo de células de mamífero. Nos propusimos estudiar la expresión de rhFGFb en biorreactores vegetales, basándonos en los antecedentes y las ventajas que brindan estos sistemas. La experiencia previa de nuestro grupo de trabajo en el uso de plantas transplásticas como biorreactores (Alfano et al., 2015; Lentz et al., 2010; Morgenfeld et al., 2020; Segretin et al., 2012) y, más específicamente, en la producción de un factor de crecimiento epidérmico (hEGF) mediante su expresión transitoria y en plantas transgénicas nucleares (Wirth et al., 2006), contribuyó a la elección de estos sistemas. Por otro lado, considerando las ventajas de *P. pastoris* para la de expresión de proteínas recombinantes eucariotas y la capacidad de este organismo de introducir

glicosilaciones, se estudió este sistema para producir tanto rhFGFb como la glicoproteína rhBMP4.

El sistema óptimo para producir una determinada proteína recombinante depende tanto de sus características intrínsecas como del organismo hospedante, y no siempre puede predecirse con precisión. Con este abordaje exploramos distintas plataformas de expresión con el fin de encontrar un sistema adecuado para la producción de factores de crecimiento recombinantes.

Hipótesis y objetivos

El **objetivo general** de este trabajo es evaluar distintos sistemas alternativos para la expresión de factores de crecimiento recombinantes. Nuestra **hipótesis** es que la producción heteróloga de factores de crecimiento en biorreactores vegetales y en el sistema de la levadura *P. pastoris* permitirá obtener proteínas recombinantes biológicamente activas.

A continuación, se detallan los **objetivos específicos**:

Capítulo 1: Expresión de rhFGFb en plantas transplastómicas de *Nicotiana tabacum*

- Obtener líneas de *Nicotiana tabacum* transplastómicas estables que expresen rhFGFb.
- Caracterizar molecular y fenotípicamente las líneas transplastómicas obtenidas.
- Desarrollar un protocolo para la extracción y purificación de rhFGFb a partir de las líneas transplastómicas.
- Confirmar la actividad biológica del factor rhFGFb purificado.
- Evaluar las bases fisiológicas subyacentes a las alteraciones fenotípicas de las líneas UTR-FGF.

Capítulo 2: Expresión transitoria de rhFGFb en plantas de *Nicotiana benthamiana*

- Desarrollar un sistema para la fusión de proteínas a distintas señales de localización subcelular.
- Evaluar los parámetros de agroinfiltración óptimos para la producción de rhFGFb.
- Comparar la expresión y acumulación de rhFGFb en distintos compartimentos subcelulares.

Capítulo 3: Expresión de factores de crecimiento recombinantes en *Pichia pastoris*

- Transformar y seleccionar clones de *P. pastoris* que expresen las proteínas recombinantes hBMP4 y hFGFb.
- Optimizar la producción de rhBMP4 y rhFGFb en cultivos de *P. pastoris*.

Resultados

Capítulo 1

Expresión de rhFGFb en plantas transplastómicas de *Nicotiana tabacum*

1. Obtención de las líneas transplastómicas UTR-FGF

Para la transformación del genoma plastídico de *N. tabacum* se generó el vector pUTR-rhFGFb (figura 7A). Se sintetizó la construcción 6xHIS-TEV-hFGFb, que contiene la secuencia codificante correspondiente a la proteína hFGFb madura (*NCBI Reference Sequence*: NG_029067.1), fusionada a una etiqueta de 6 histidinas *N*-terminal (6xHIS). La secuencia sintética 6xHIS-TEV-hFGFb se sub-clonó en los sitios *Nde*I y *Xba*I del vector pUTR (Segretin et al., 2012; Wirth et al., 2004).

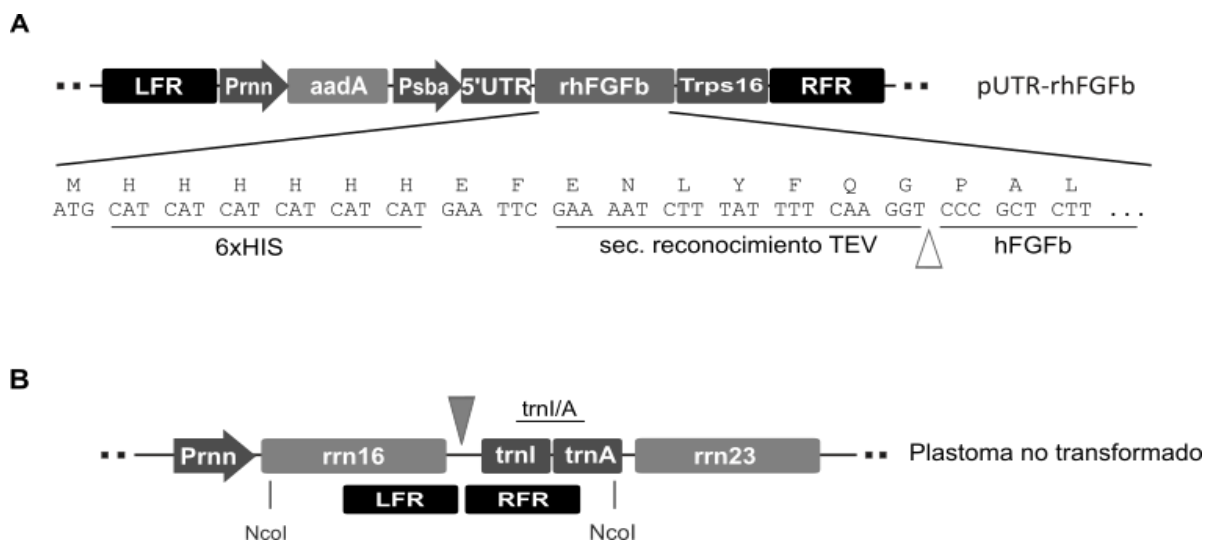


Figura 7. Construcción genética diseñada para la expresión de rhFGFb en plantas transplastómicas de *N. tabacum* (A) Cassette de expresión del vector pUTR-rhFGFb. La secuencia codificante de *hFGFb* se encuentra fusionada a una etiqueta de histidinas *N*-terminal (6xHIS) y a la secuencia codificante del sitio de reconocimiento de la proteasa TEV del *tobacco etch virus*. Se marca el sitio de corte de la proteasa TEV. (B) Esquema del sitio de integración en el plastoma. Los transgenes se integran por recombinación homóloga en la región intergénica entre *rrn16* y *trnI* (flecha gris). **LFR, RFR:** regiones recombinogénicas; **Prnn:** Promotor constitutivo; **aadA:** secuencia codificante del gen de resistencia a espectinomicina; **Psba y 5'UTR:** promotor y secuencia 5' no traducible del gen *psbA* de *N. tabacum*; **Trps16:** región terminadora del gen *rps16*; **rhFGFb:** transgen 6xHIS-TEV-hFGFb.

El transgen 6xHIS-TEV-hFGFb (de ahora en adelante denominado hFGFb) se insertó río abajo del promotor del gen inducible por luz *psbA* (Bruick y Mayfield, 1999) y la secuencia 5' no traducible (5'UTR) del mismo gen. La secuencia 5'UTR elegida contribuye a la estabilidad del mensajero y a una mayor expresión del transgen (Eibl et al., 1999; Fernández-San Millán et al., 2003). Como terminador de la transcripción posee la secuencia terminadora obtenida del gen *rps16*. A su vez, el vector posee un gen de

resistencia a espectinomicina (*aadA*), regulado por el promotor constitutivo del operón *rrn* (*Prnn*) y la secuencia terminadora del gen *rps16*. El cassette de expresión del transgen y el gen selector se encuentran flanqueados por dos regiones recombinogénicas (LFR, RFR, figura 7) que permiten la inserción de los transgenes en el plastoma por recombinación homóloga; específicamente en la región intergénica entre los genes del ARN ribosomal 16S y del ARN de transferencia para isoleucina (*trnI*), dentro de las regiones repetidas invertidas (RIa y RIb; figura 2).

Se transformaron hojas de *N. tabacum* cv. Petit havana con el vector pUTR-rhFGFb mediante la técnica de biobalística y se obtuvieron 9 brotes regenerantes. La naturaleza transplastómica de los brotes regenerantes se evaluó mediante PCR, confirmando la integración del transgen en 5 de ellos (figura 8). Los brotes positivos para el análisis de PCR fueron sometidos a sucesivas rondas de regeneración en medio RMOP con espectinomicina para alcanzar el estado de homoplastía y posteriormente rusticados para la obtención de semillas.

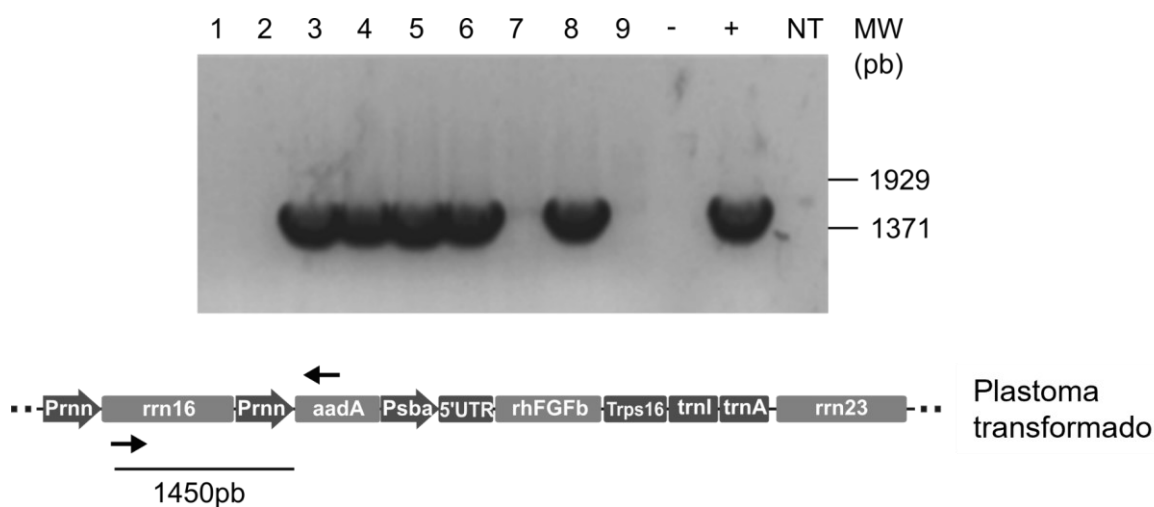


Figura 8. Análisis de integración del transgen por PCR. Los oligonucleótidos iniciadores utilizados hibridan sobre el *rrn16* y el gen *aadA* (flechas negras). Se utilizó como control positivo (+) una línea transplastómica previamente caracterizada y como control negativo una planta de tabaco no transformada (NT).

Se analizó el fenotipo de las plantas de tercera ronda de regeneración *in vitro*, observando características fenotípicas compatibles con homoplastia en las líneas UTR-FGF 3, 4 y 6. En cambio, las líneas UTR-FGF 5 y 8 mostraron irregularidades en la morfología de sus hojas, lo que sugirió que las plantas eran heteroplásticas. La

heteroplastía se asocia a fenotipos con morfología foliar alterada en plantas crecidas en presencia de espectinomicina como consecuencia de un arresto traduccional en las células no transformadas (Ahler et al., 2003).

El análisis fenotípico de las líneas UTR-FGF crecidas en tierra mostró un crecimiento retardado, clorosis y retraso en la floración en comparación con las líneas no transformadas (figura 9). La línea UTR-FGF 6 presentó además un déficit en la floración y generación de semillas, a partir de la generación T1. Debido a la dificultad en la obtención de semillas, se seleccionaron las líneas UTR-FGF 3 y UTR-FGF 4 para continuar el trabajo. En la *sección 1.6.1* se muestra un análisis fenotípico más detallado de estas dos líneas.

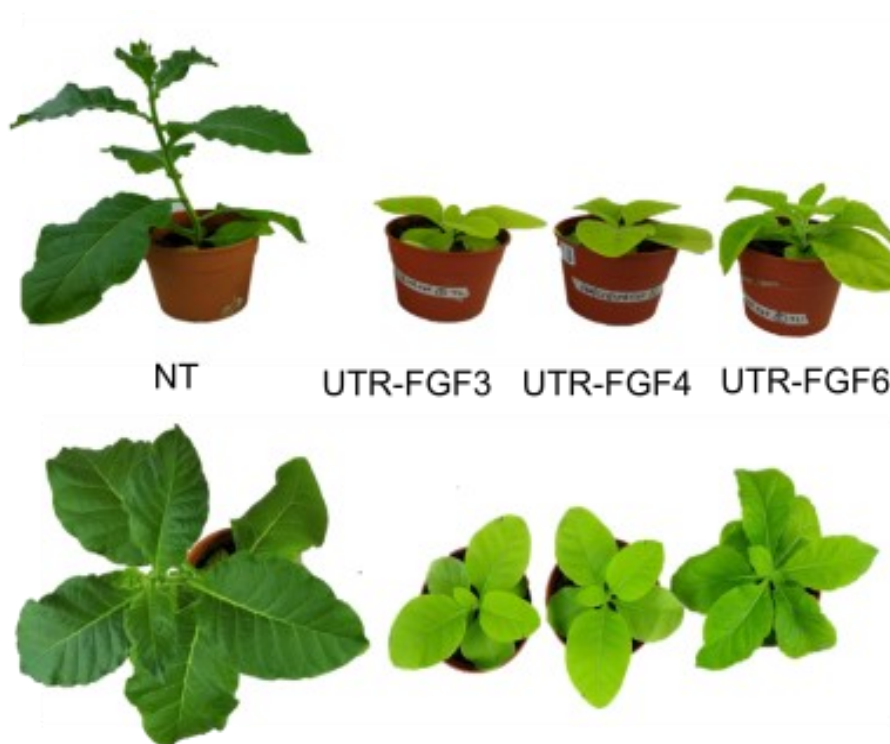


Figura 9. Fenotipo de las líneas transplastómicas UTR-FGF. Se germinaron semillas de plantas transplastómicas rusticadas (T1) en medio con agente selector. Las plántulas se traspasaron a tierra y se crecieron en condiciones de invernadero (16hs luz, 100–300 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, 26°C). Se muestra una foto representativa de las distintas líneas luego de seis semanas del pasaje a tierra.

2. Las líneas UTR-FGF 3 y 4 son homoplásticas

Para determinar el grado de homoplasia de las líneas UTR-FGF y evaluar la integridad de la construcción genética, llevamos a cabo un ensayo de *Southern blot*. Extractos de ADN total de hojas de plantas transplastómicas se digirieron con la enzima NcoI, la cual posee dos sitios de reconocimiento flanqueando el sitio de integración y ningún sitio de reconocimiento dentro de la construcción genética. Utilizamos para la hibridación la sonda trnI/A que permite distinguir entre el plastoma no transformado (6,4 kpb) y las copias transformadas del genoma plastídico (8,3 kpb).

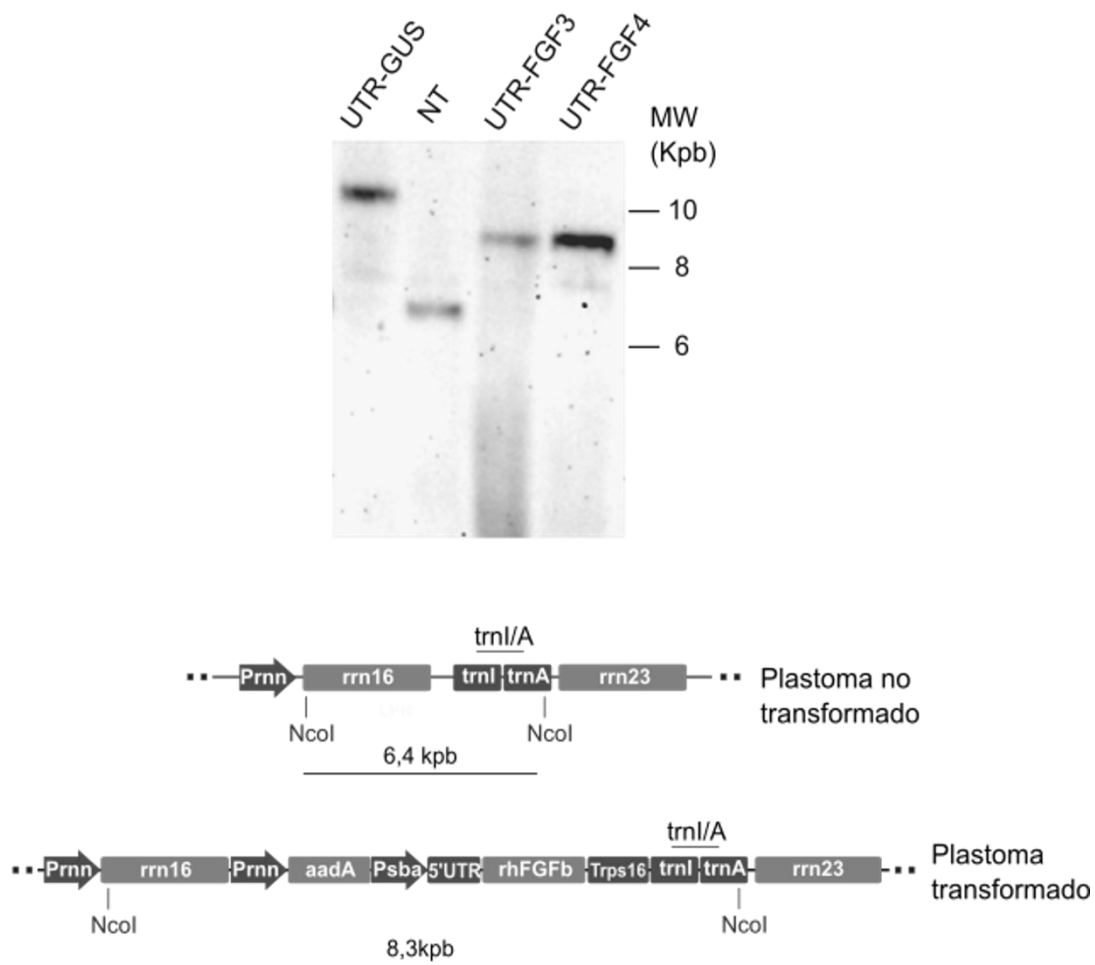


Figura 10. Caracterización molecular mediante *Southern blot*. *Southern blot* (arriba) y representación esquemática del plastoma transformado y no transformado (abajo) mostrando el sitio de reconocimiento de NcoI y la hibridación de la sonda trnI/A. **UTR-GUS**: planta transplastómica no relacionada; **NT**: *N. tabacum* no transformada; **UTR-FGF**: líneas transplastómicas.

El ensayo reveló una banda específica correspondiente al peso molecular esperado para el plastoma transformado en ambas líneas UTR-FGF (figura 10). La ausencia de una banda del peso molecular correspondiente al plastoma no transformado sugiere que las líneas UTR-FGF 3 y 4 son homoplásticas. A su vez, la ausencia de bandas de pesos distintos al esperado indicaría que no hubo rearrreglos genéticos en estas líneas.

Para corroborar la estabilidad de las líneas obtenidas se germinaron 100 semillas de las líneas transplastómicas y de plantas no transformadas en medio MS con o sin antibiótico. Como se observa en la figura 11, todas las semillas que germinaron en medio selectivo dieron lugar a plántulas de color verde. Estos resultados demuestran que el transgen es heredable, y refuerzan la conclusión de que las líneas UTR-FGF son homoplásticas. A su vez, no se registraron diferencias significativas en la tasa de germinación de las líneas UTR-FGF respecto de la línea NT.

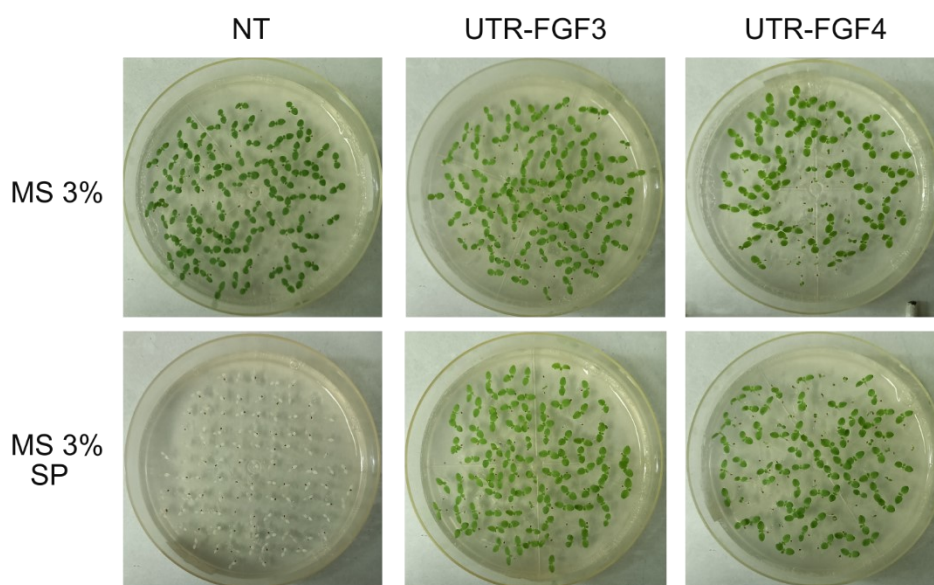


Figura 11. Ensayo de germinación. Se germinaron 100 semillas de cada línea en medio MS con o sin espectinomicina (SP). Las fotografías fueron tomadas a los 7 días post-germinación.

3. Las líneas transplastómicas UTR-FGF acumulan la proteína rhFGFb

Evaluamos la expresión y acumulación de la proteína recombinante en las líneas UTR-FGF mediante un ensayo de *western blot* utilizando anticuerpos específicos anti-HIS y anti-FGF. Se detectó una banda del peso molecular esperado para rhFGFb (18

kDa), indicando que las líneas expresan y acumulan la proteína recombinante. Al revelar con ambos anticuerpos en simultáneo pudimos verificar la identidad de la proteína recombinante, ya que ambos anticuerpos revelaron una banda del mismo peso molecular aparente (figura 12A).

Para evaluar la estabilidad de la proteína recombinante, analizamos la acumulación de rhFGFb en hojas de distintos estadios de desarrollo. Como se observa en la figura 12B, la intensidad de la banda revelada con el anticuerpo anti-HIS es similar para todas las hojas analizadas. Este resultado sugiere que la edad de la hoja no afecta la acumulación de la proteína recombinante.

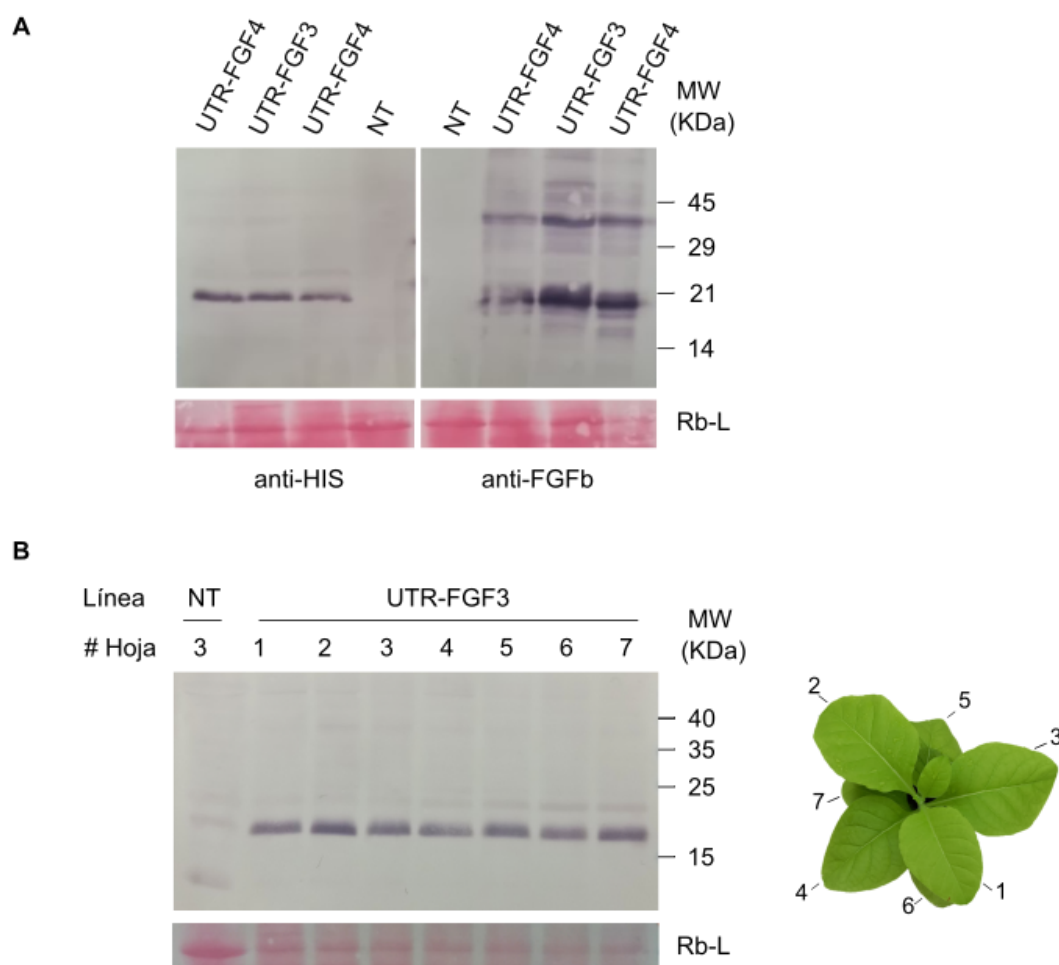


Figura 12. Análisis de la acumulación de proteínas en líneas transplastómicas UTR-FGF. (A) *Western blot* de fracciones de las líneas UTR-FGF3, UTR-FGF4 y plantas no transformadas (NT) revelado con un anticuerpo anti-HIS (izquierda) o anti-FGF (derecha). (B) Acumulación de rhFGFb en hojas de distintas edades por *western blot* con un anticuerpo anti-HIS. Las diferentes

hojas utilizadas se marcan con números contando desde la primera hoja completamente expandida. Se muestra una imagen representativa del ensayo realizado con dos réplicas biológicas. La subunidad mayor de RuBisCo (Rb-L) se utilizó como control de carga (tinción con *rojo ponceau*).

4. La proteína rhFGFb puede purificarse a partir de hojas de plantas transplastómicas

4.1 Desarrollo de un protocolo de purificación por cromatografía de afinidad

Con el objetivo de obtener una proteína recombinante de pureza suficiente para los ensayos de actividad biológica, se desarrolló un protocolo de purificación de rhFGFb utilizando columnas cromatográficas de Ni-NTA. El protocolo involucra el molido de hojas frescas utilizando nitrógeno líquido, la resuspensión en un *buffer* de extracción y la siembra de la fracción soluble, lavado y elución por gravedad en columnas de Ni-NTA (figura 13, materiales y métodos *sección 7.2.4*).

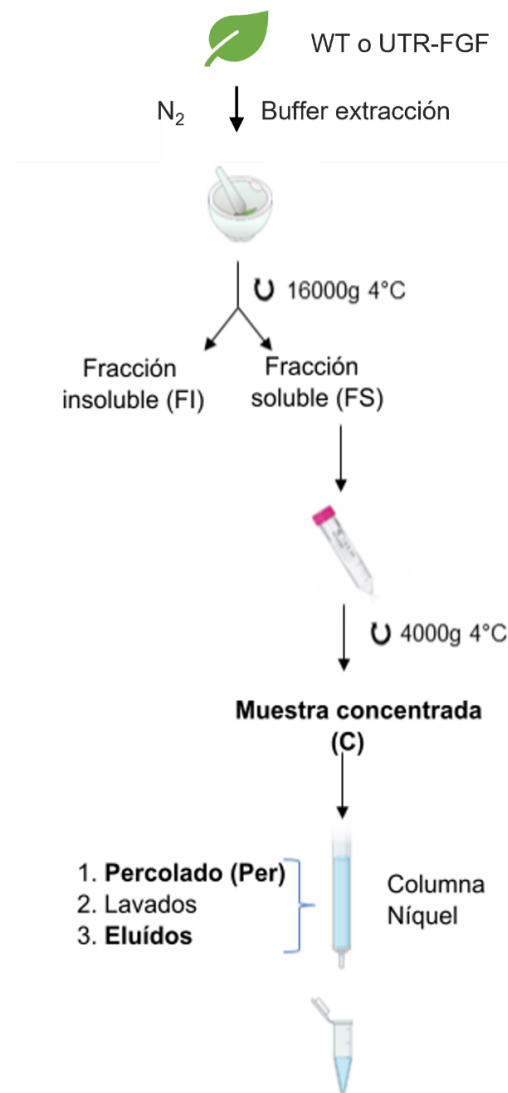


Figura 13. Representación esquemática del protocolo de purificación de rhFGFb a partir de hojas de plantas transplastónicas.

En primer lugar, evaluamos la solubilidad de la proteína recombinante en el *buffer* seleccionado para la purificación. Como se observa en la figura 14, se logró obtener rhFGFb en la fracción soluble, lo cual permitió avanzar con los siguientes pasos del protocolo. Cabe destacar, que una proporción del rhFGFb total resultó insoluble bajo las condiciones analizadas.

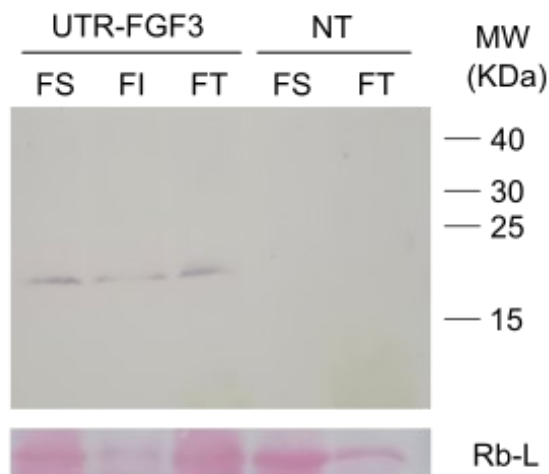


Figura 14. Análisis de solubilidad de rhFGFb. Se analizaron diferentes fracciones del protocolo de purificación mediante *western blot* con anticuerpo anti-HIS. La subunidad grande de RuBisCo (Rb-L) se utilizó como control de carga (tinción con *rojo ponceau*). **TF:** fracción total, **IF:** fracción insoluble, **SF:** fracción soluble.

A continuación, se realizó una primera prueba de purificación según el protocolo diseñado (figura 13). Para evaluar si la utilización de inhibidores de proteasas tiene efectos sobre la eficiencia del proceso, se agregó un *cocktail* de inhibidores de proteasas en distintos pasos: el *buffer* de extracción, el *buffer* de resuspensión y el *buffer* de elución. Se realizó en paralelo una purificación control en la cual no se agregaron inhibidores. Las distintas fracciones del protocolo de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE y *western blot*. Se detectó la presencia de una banda del peso molecular esperado para rhFGFb en los eluidos 2-4, obteniendo la mayor proporción de proteína recombinante en el eluido 3 (figura 15A). Por otro lado, el perfil de proteínas totales (figura 15B) mostró que la fracción correspondiente al E3 se encuentra enriquecida en la proteína recombinante. En conjunto, estas observaciones demostraron que el protocolo desarrollado permite recuperar la proteína recombinante purificada.

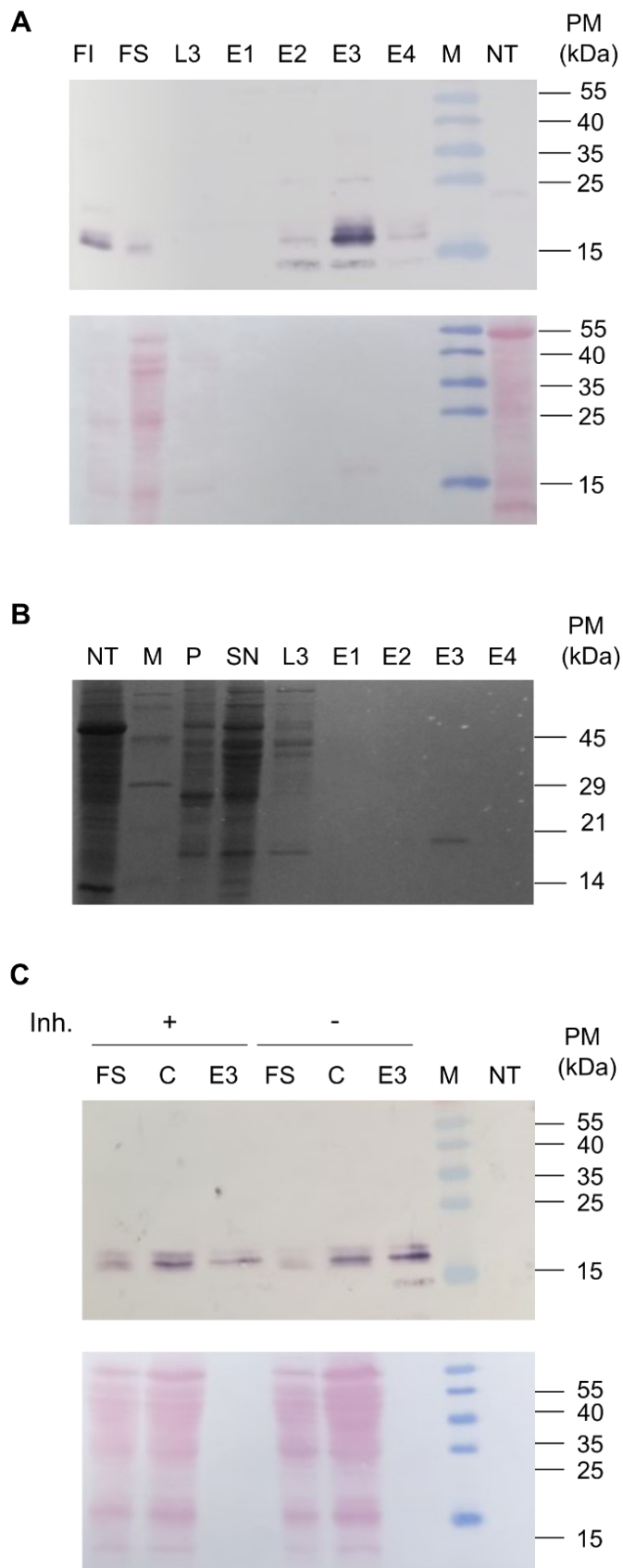


Figura 15. Prueba de purificación de rhFGFb y efecto de inhibidores de proteasas sobre la estabilidad de la proteína. (A y B) Perfil de purificación con inhibidores de proteasas. Las distintas fracciones del protocolo de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE 15% (A) *Western blot* revelado con anti-HIS (B) Tinción de proteínas totales con *coomassie brilliant blue*. (C) *Western blot* revelado con anti-HIS de distintas fracciones claves de la purificación en presencia o ausencia de inhibidor. Para (A) y (B) se muestran las membranas teñidas con *rojo ponceau* como control de la transferencia. **FI:** fracción insoluble; **FS:** fracción soluble; **C:** muestra concentrada; **L3:** lavado 3; **E1-E4:** Eluídos; **NT:** Fracción soluble de planta NT. **M:** marcador de peso molecular Pageruler™ ThermoFisher (A y C) o Marker de Proteínas PB-L (B). Para (A) y (B) se muestran las membranas teñidas con *rojo ponceau* como control de la transferencia.

Para evaluar el efecto de los inhibidores de proteasas sobre la estabilidad de la proteína recombinante, se analizaron distintas fracciones de la purificación realizada con el agregado de inhibidores y la purificación control. Como se observa en la figura 15C, se detectó una banda de mayor intensidad en la fracción correspondiente al eluido 3 (E3) con inhibidores de proteasas respecto a la misma fracción sin inhibidores, indicando que el agregado de inhibidores de proteasas permite recuperar una mayor cantidad de proteína recombinante. Al analizar la fracción soluble (FS) y la fracción correspondiente al concentrado (C), no se observaron diferencias notorias en la intensidad de la banda revelada en presencia o ausencia de inhibidores. Por esta razón, consideramos que el paso crítico para el agregado de inhibidores es inmediatamente antes de la siembra de la muestra en la columna.

4.2 Purificación de rhFGFb a partir de hojas de plantas transplastómicas

Con el objetivo de obtener una proteína recombinante de pureza suficiente para realizar ensayos de actividad biológica, se implementó el protocolo de purificación por columnas de Ni-NTA desarrollado en la *sección 1.4.1*. Las distintas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y *western blot*. Puede observarse que el contenido de proteínas totales en las fracciones evaluadas disminuyó conforme avanzó el proceso de purificación (figura 16A). A su vez, detectamos la presencia de una banda del peso molecular esperado para rhFGFb (18 kDa) en los eluidos E3 y E4, obteniendo la mayor proporción de proteína recombinante en el eluido E3 (figura 16B).

El análisis por *western blot* con el anticuerpo anti-FGF permitió corroborar la identidad de la banda observada en el eluido E3 (figura 16C). Además, al revelar con este anticuerpo observamos una banda específica en el eluido E1; la banda revelada mostró un peso ligeramente menor al esperado para 6xHIS-rhFGFb y no pudo ser detectada con el anticuerpo anti-HIS. Esta observación sugiere que una fracción de rhFGFb perdió la etiqueta 6xHIS.

Para obtener la proteína recombinante en condiciones adecuadas para los ensayos de actividad biológica, se esterilizó la fracción E3 por filtración. A continuación, se intercambió el *buffer* por un *buffer* de similares características del rhFGFb comercial (Gibco FGF, PHG0026). De esta manera, obtuvimos la fracción de la proteína rhFGFb purificada (en adelante denominada rhFGFb vegetal).

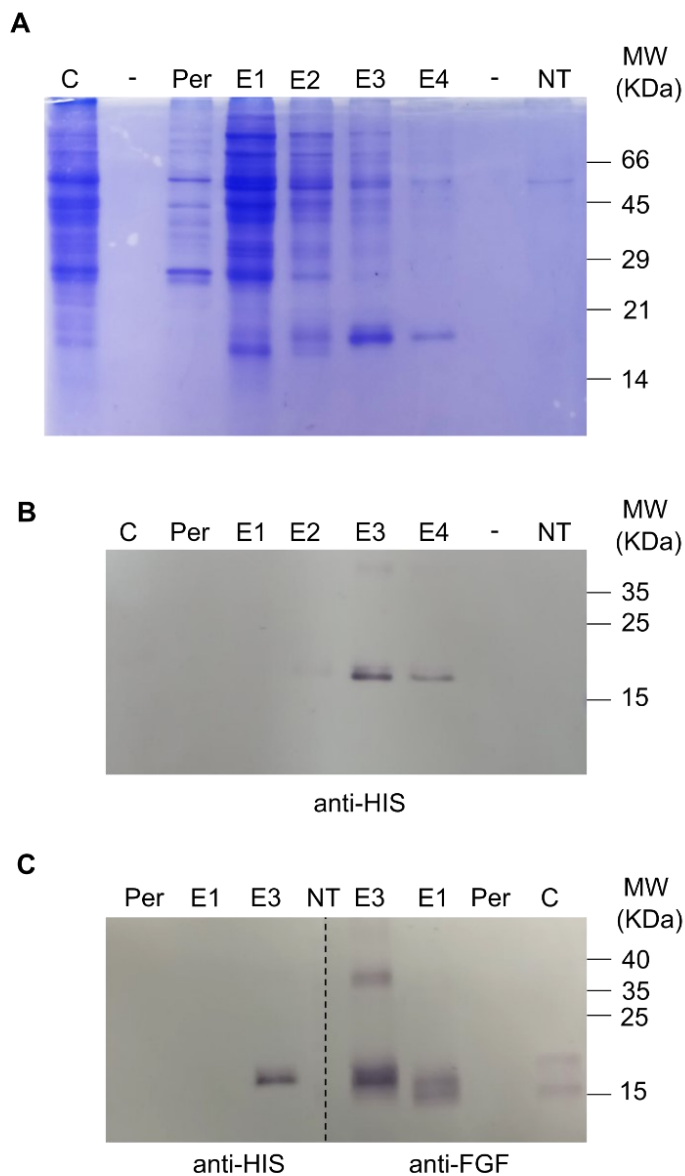


Figura 16. Perfil de purificación de rhFGFb. (A) Las distintas fracciones del protocolo de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con *Coomassie brilliant blue* (A) o *western blot* (B). (C) Fracciones relevantes del protocolo de purificación se analizaron mediante *western blot* revelado con un anticuerpo anti-HIS (izquierda) o un anti-FGF (derecha). **C:** muestra concentrada **Per:** percolado; **E1-E4:** Eluídos; **-:** calle vacía; **NT:** Eluido E3 de la planta NT.

Para determinar la concentración del rhFGFb vegetal y estimar el rendimiento de la purificación, realizamos una cuantificación por densitometría (figura 17). Se analizaron por *western blot* distintas diluciones del rhFGFb vegetal (E3F) y el rhFGFb recuperado en la fracción soluble (FS), junto con una curva estándar con concentraciones conocidas del rhFGFb comercial (Gibco FGF, PHG0026). El *western blot* fue revelado utilizando un anticuerpo específico anti-FGF. La masa de rhFGFb en las distintas fracciones se determinó por comparación de la intensidad de bandas respecto a la curva estándar

(tabla 2). A partir de los resultados obtenidos se estimó que las plantas UTR-FGF3 expresan un total de 0,3 % de la proteína total soluble (PTS).

Fracción	Concentración / Porcentaje
Fracción soluble	$34 \pm 2 \mu\text{g rhFGFb} / \text{gr tejido fresco}$
rhFGFb purificado	$1,5 \pm 0,2 \mu\text{g rhFGFb} / \text{gr tejido fresco}$
% Recuperación (rhFGFb purificado/Fracción soluble)	4,4%

Tabla 2. Rendimiento del protocolo de purificación. Se muestran la media $\pm$ desvío estándar de dos ensayos independientes.

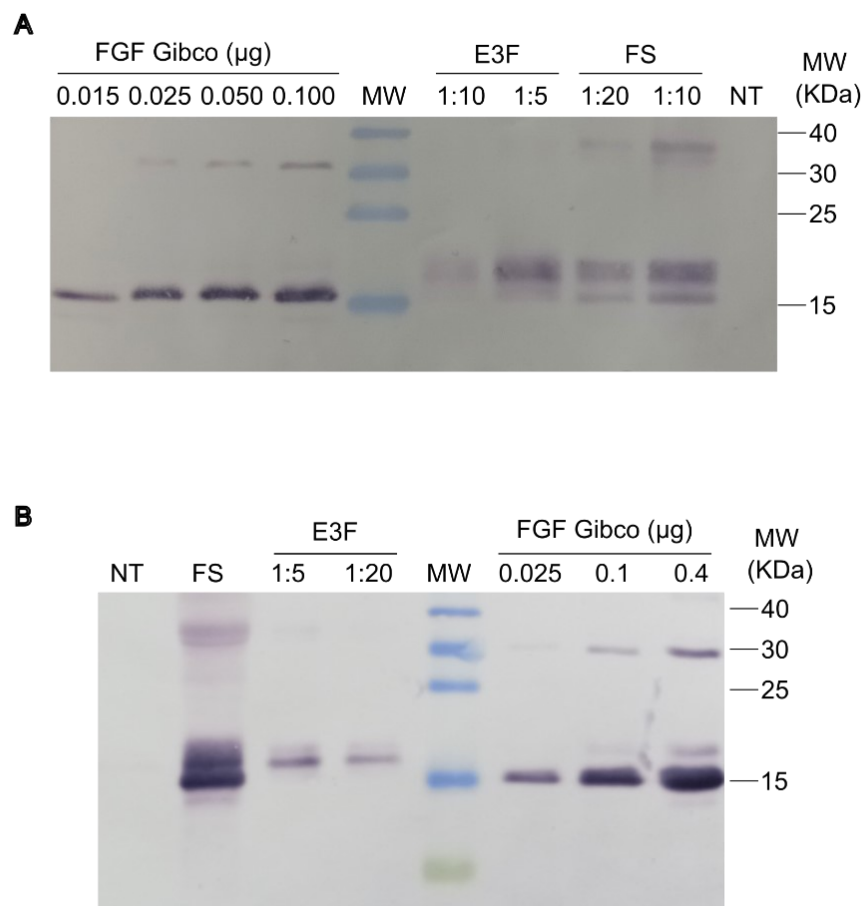


Figura 17. Cuantificación de rhFGFb por densitometría. Distintas diluciones de las fracciones del ensayo de purificación 1 (A) y el ensayo de purificación 2 (B) se sembraron en un gel poliacrilamida, en paralelo con una curva estándar de rhFGFb comercial (Gibco, PHG0026). Se realizó un análisis por *western blot* con un anticuerpo anti-FGF. **E3F:** Eluido 3 filtrado; **FS:** Fracción soluble; **NT:** Eluido 3 de plantas NT.

En la figura 17B se observa una banda adicional para la FS revelada con anti-FGF, de menor peso molecular al esperado para rhFGFb. El peso aparente de dicha banda coincidiría con el de la proteína rhFGFb procesada, sin la etiqueta de histidinas. Estos resultados son consistentes con lo observado en la figura 14B (calles correspondientes al E1) e indicarían que existió un procesamiento que ocasionó la pérdida de la etiqueta 6xHIS durante el proceso de extracción y purificación. Dado que el rhFGFb sin la etiqueta 6xHIS no puede ser purificado mediante una columna Ni-NTA, su procesamiento tendría un impacto negativo en el rendimiento de la purificación. No obstante, el porcentaje de recuperación de rhFGFb obtenido (aproximadamente 4,4%) resultó suficiente para los ensayos de actividad biológica.

5. La proteína rhFGFb purificada induce la proliferación de células HEK293

Para evaluar la actividad biológica del rhFGFb recombinante purificado (denominado rhFGFb vegetal) se trataron células HEK293T con el extracto purificado para determinar la tasa de proliferación celular mediante el ensayo de azul de Alamar (AB) (O'Brien et al., 2000). Estos ensayos fueron realizados en el marco de una colaboración con la Dra. Carolina Perez Castro del instituto IBioBA – CONICET.

Se utilizó como control negativo extractos obtenidos de plantas no transformadas (eluído E3 de planta NT) y como control positivo la proteína recombinante comercial (Gibco FGF, PHG0026). Los valores de proliferación se normalizaron a los observados con el extracto NT. La estimulación con rhFGFb vegetal provocó un aumento significativo en la proliferación de células HEK293T de 1.4 veces comparado con las células tratadas con extracto de plantas no transformadas (figura 18). Este resultado indica que el rhFGFb recombinante es biológicamente activo, y puede inducir la proliferación de células madre embrionarias *in vitro*.

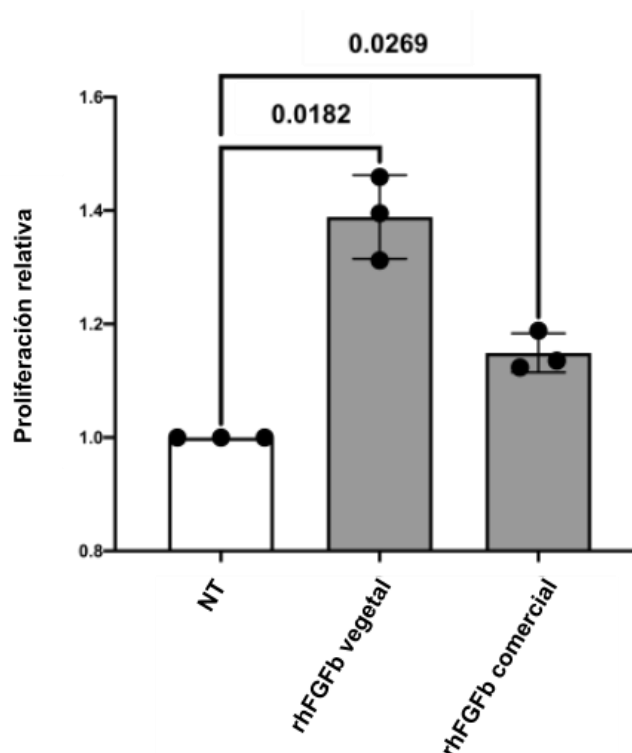


Figura 18. Ensayo de proliferación en células HEK293T. Medición de proliferación celular mediante el método Alamar en células HEK293T estimuladas con el rhFGFb vegetal, rhFGFb comercial (Gibco FGF, PHG0026), o extracto de planta sin transformar (NT). La medición se realizó a las 24hs post-estimulación. El análisis de datos se realizó por comparación de medias de control NT vs rhFGFb vegetal ($p = 0,0182$) o rhFGFb comercial, PHG0026 ($p = 0,0269$) mediante ANOVA unidireccional ($n=3$).

6. Evaluación de los efectos pleiotrópicos asociados a la expresión de rhFGFb

A pesar de las ventajas de la transformación de cloroplastos, esta metodología cuenta con la limitación de la aparición de efectos pleiotrópicos en algunas plantas transplastómicas. Estos efectos pueden estar relacionados con las secuencias regulatorias del cassette de expresión, heteroplastia, rearrreglos genéticos o una toxicidad de la proteína recombinante (Ahlert et al., 2003; Rogalski et al., 2008; Scotti y Cardi, 2014).

Los fenotipos registrados en las líneas UTR-FGF, descritos en la *sección 1.1*, indican que la expresión de rhFGFb tendría un impacto en el desarrollo y/o el desempeño fotosintético de estas plantas. El análisis molecular de las líneas UTR-FGF mostró que son homoplásticas y no existen evidencias de rearrreglos genéticos. A su vez, experiencia previa del laboratorio demostró que el vector de transformación pUTR permite expresar proteínas recombinantes sin alteraciones fenotípicas evidentes (Alfano

et al., 2015; Lentz et al., 2010), lo que indicaría que los elementos regulatorios no estarían involucrados en el fenotipo de las líneas UTR-FGF. En función de estas evidencias, nos planteamos la **hipótesis** de que la acumulación de rhFGFb en el estroma podría tener un efecto tóxico sobre la fisiología del cloroplasto.

6.1. Las líneas UTR-FGF muestran un marcado retraso en su crecimiento

Para conocer la magnitud del déficit en el desarrollo de las líneas UTR-FGF, se realizó una caracterización fenotípica que incluyó estudios de crecimiento, floración y germinación. En primer lugar, se realizó un análisis de su crecimiento en maceta, registrando tanto el número de hojas expandidas como su tamaño a lo largo del tiempo. Se incluyó en los análisis a la línea transplastómica UTR-GUS previamente desarrollada en el laboratorio que no presenta impedimentos en su desarrollo y cuyo fenotipo resulta indistinguible de una planta no transformada (Segretin et al., 2012).

Los resultados revelaron un retraso en el crecimiento de entre tres a cuatro semanas para las líneas UTR-FGF respecto de las plantas no transformadas (NT) (figura 19, tabla 3), tomando en cuenta la cantidad de hojas desarrolladas. A su vez, se determinó que existe un retraso de 10 semanas en la floración de las líneas UTR-FGF respecto a las plantas no transformadas. Sin embargo, ambas líneas transplastómicas produjeron semillas viables, sin diferencias significativas en la tasa de germinación respecto de la planta no transformada y la línea transplastómica UTR-GUS. Por otro lado, el fenotipo clorótico observado en las plantas transplastómicas se correspondió con una disminución en los niveles de clorofila, medidos en unidades SPAD (*Specific Photon Avalanche Diode*) (tabla 3).

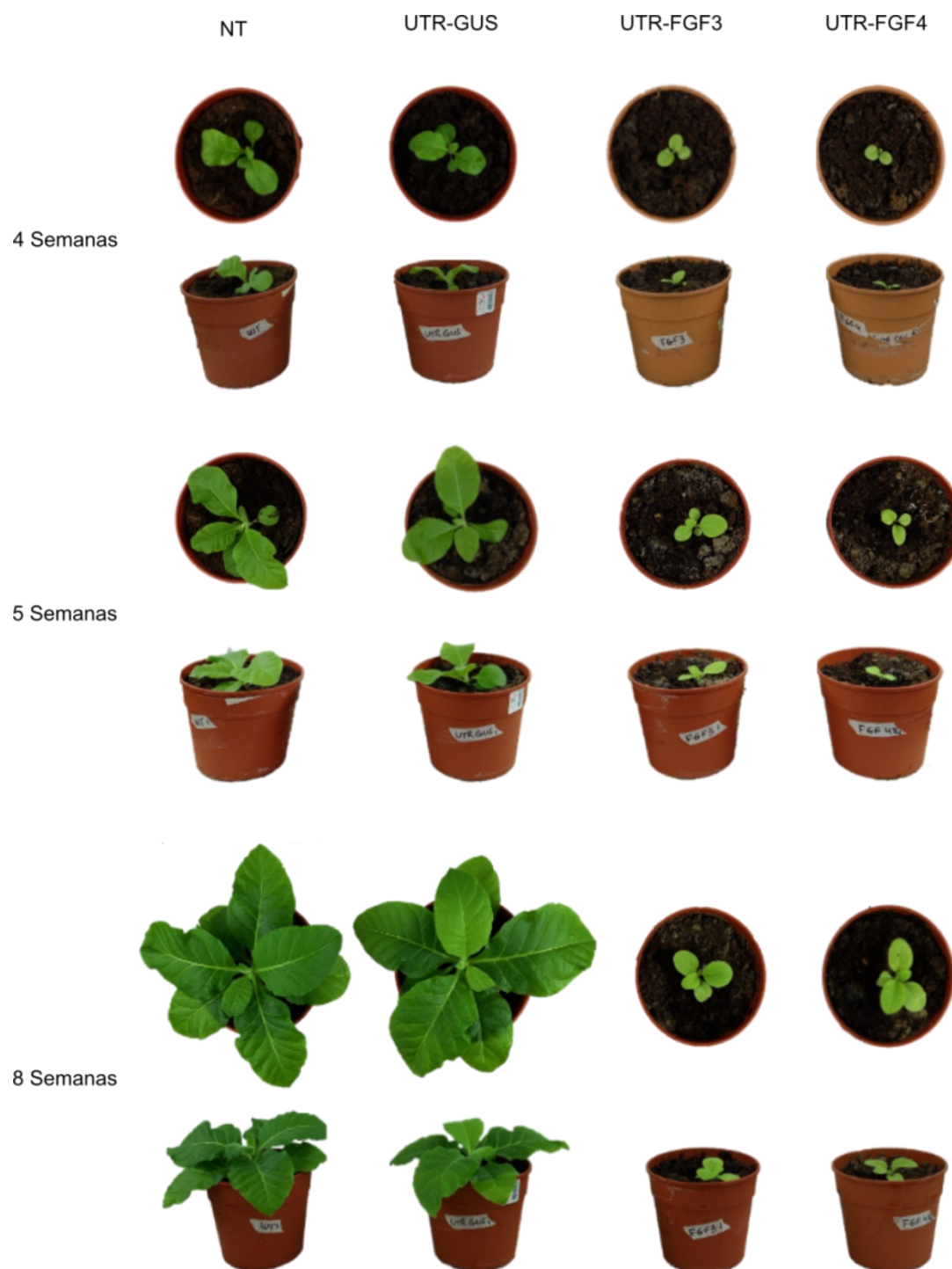


Figura 19. Fenotipo de líneas transplastómicas UTR-FGF. Evolución del fenotipo de plantas transplastómicas cultivadas en tierra en condiciones de invernadero (16 h de luz, 100–300 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, 26°C). Se incluyen líneas NT y UTR-GUS para su comparación.

Línea	NT	UTR-FGF 3	UTR-FGF 4	UTR-GUS
Tasa de germinación (%)	92,7 ± 6,9 (a)	93,4 ± 5,7 (a)	93,9 ± 3,9 (a)	97%
Fluorescencia de clorofila (SPAD)	27,26 ± 4,54 (a)	10,02 ± 2,02 (b)	10,40 ± 2,39 (b)	21,36 ± 1,53
Número de hojas (planta 4 semanas)	4-5	3	3	4-5
Número de hojas (planta 5 semanas)	5	4	3-4	5
Número de hojas (planta 8 semanas)	8-9	5	5	8-9
Número de hojas al momento de la floración	15-16	13-14	13-14	15-16
Tiempo de floración (semanas)	12	22	22	12

Tabla 3. Caracterización fenotípica de líneas transplastómicas UTR-FGF. Los valores se informan como media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos independientes (tasa de germinación) y al menos 11 plantas (fluorescencia de clorofila). El análisis de número de hojas y tiempo de floración se realizó con $n=4$. Las letras representan significancia analizada en una prueba t ($p<0,05$). El análisis estadístico de UTR-GUS no se llevó a cabo debido a la falta de réplicas biológicas.

6.2 La expresión de *rhFGFb* tiene un impacto negativo en el desempeño fotosintético de las líneas UTR-FGF

En función del fenotipo clorótico de las líneas UTR-FGF, decidimos estudiar si la expresión de la proteína recombinante tiene un efecto sobre la eficiencia fotosintética de las plantas. La eficiencia del proceso de fotosíntesis dependerá de la cantidad y disposición de las distintas proteínas que componen los fotosistemas (PS), los complejos colectores de luz o antena (del inglés, *light harvest complex LHC*) y la cadena de transporte de electrones, organizados dentro de la membrana tilacoides (Messant et al., 2021).

Las reacciones de fotoquímica involucran la transferencia de un electrón desde la clorofila *a* a través de una cadena de transporte de electrones, y comprenden la base de la conversión de energía lumínica en energía química. Cuando un fotón incide en la clorofila, la molécula pasa a un estado excitado y puede liberar la energía absorbida a través de tres procesos: la liberación de calor, la emisión de un fotón por medio de fluorescencia, o la transferencia de electrones a otra molécula (Nimir et al., 2018). La

emisión de fluorescencia por parte de la clorofila correlaciona de forma inversa con las reacciones de fotoquímica y la liberación de energía por calor, por lo que la medición de la fluorescencia de la clorofila *a* permite medir la eficiencia fotosintética *in vivo* (Baker, 2008).

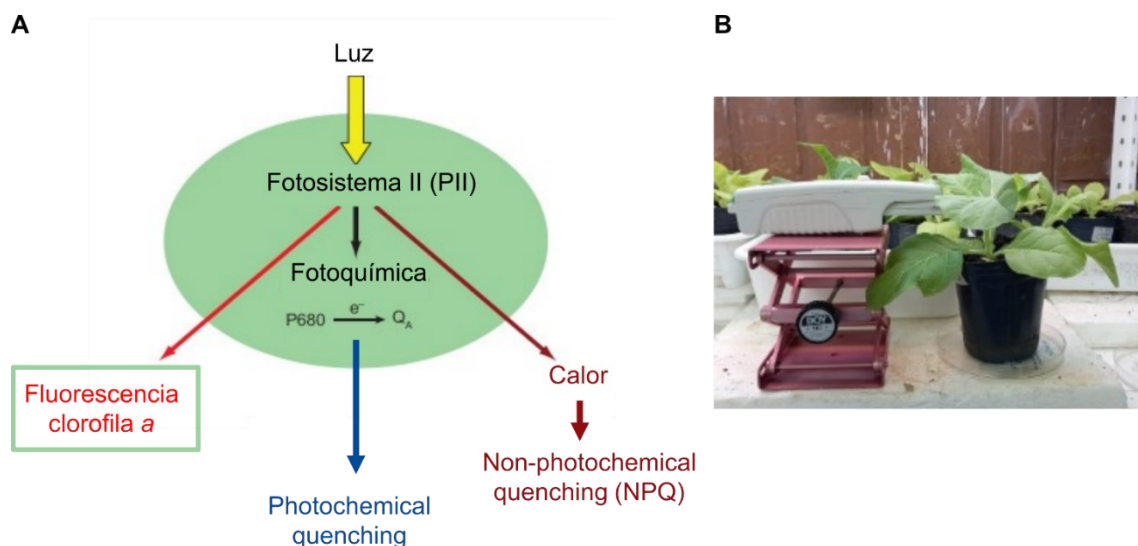


Figura 20. Medición de parámetros fotosintéticos por la técnica de PAM. (A) Modelo de procesos que ocurren luego de la incidencia de la luz en el fotosistema II (PSII). Adaptado de Baker et al. (B) Medición de parámetros fotosintéticos mediante la técnica de PAM (*pulse amplitud modulation*) en una planta de tabaco no transformada de 5 semanas de edad.

Se midió la fluorescencia de la clorofila mediante la técnica de PAM (*pulse amplitud modulation*) en plantas adaptadas a oscuridad (*dark-adapted state*) y plantas adaptadas a la luz (*light-adapted-state*), utilizando el equipo PhotosynQ (figura 20). Estas mediciones las realizamos en el instituto CEFOT (Rosario) en el marco de una colaboración con el Dr. Nicolás Blanco.

Teniendo en cuenta las diferencias en cuanto al crecimiento de las líneas analizadas, se trabajó con plantas de distintas edades cronológicas pero que estuvieran en un estadio de desarrollo similar. Por consiguiente, realizamos las mediciones en plantas de 6 semanas de edad para las plantas NT y UTR-GUS, y 9 semanas de edad para las líneas UTR-FGF (figura 21).

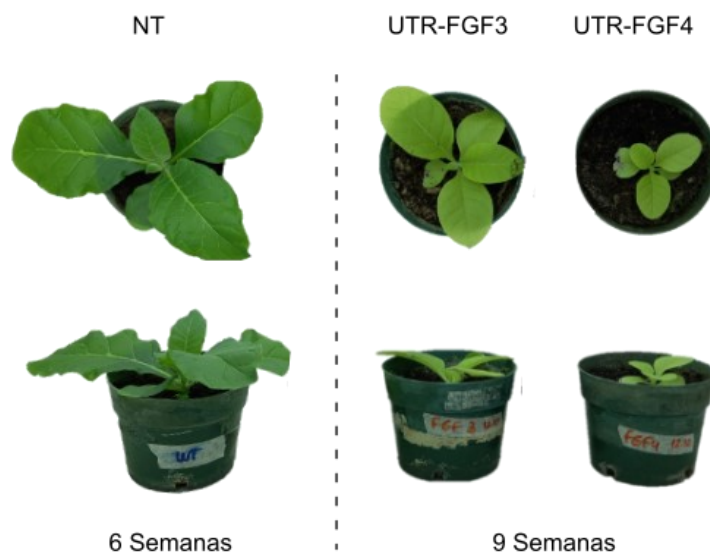


Figura 21: Estadios del desarrollo de las plantas UTR-FGF y NT seleccionados para los análisis fisiológicos. Fotos representativas de los estadios elegidos. Las plantas fueron germinadas en tierra y crecidas en condiciones de invernadero (16 h de luz, 100–300 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, 26°C).

La medición en hojas adaptadas a la oscuridad mide la emisión de fluorescencia en un estado donde todas las plastoquinonas están oxidadas. En estas condiciones, el PSII se considera “abierto” y es posible determinar su capacidad máxima de conducir fotoquímica, parámetro denominado eficiencia máxima del PSII (F_v/F_m). En plantas salvajes que se encuentran en condiciones de crecimiento óptimas, y que no fueron sometidas a estrés, el valor promedio de F_v/F_m se encuentra alrededor de 0,8 (Baker, 2008).

El análisis en hojas adaptadas a la oscuridad reveló que existe una disminución significativa de F_v/F_m en plantas UTR-FGF 3 y UTR-FGF 4, siendo aproximadamente dos veces menor en la línea UTR-FGF respecto a las plantas no transformadas (figura 22). La línea transplastómica UTR-GUS no mostró diferencias significativas con las plantas NT. Estos resultados demostraron que las líneas transplastómicas UTR-FGF presentan una reducción en su capacidad fotosintética máxima, asociada a la expresión de la proteína rhFGFb.

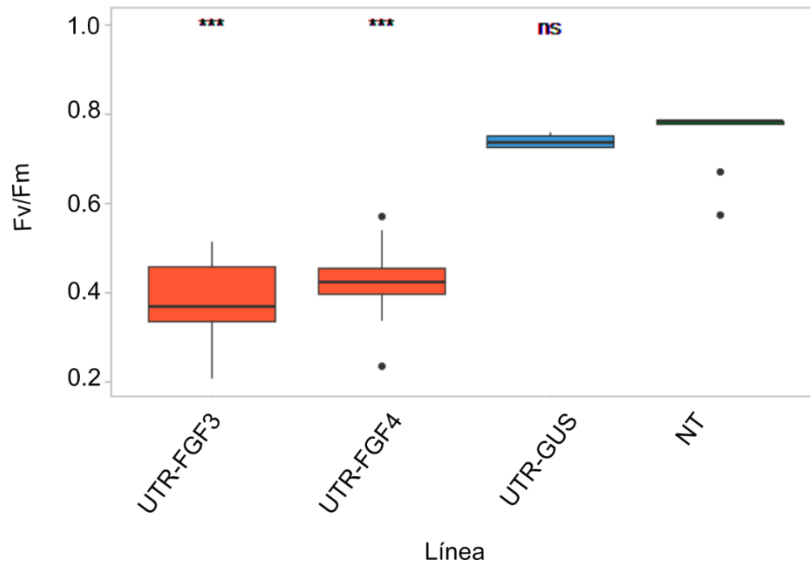


Figura 22. Determinación de la eficiencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m). Box plot obtenido a partir de los valores de F_v/F_m obtenidos a partir de 11 plantas (NT y UTR-FGF) o 3 plantas (UTR-GUS). Los asteriscos muestran diferencias significativas respecto a la línea NT ($p < 0.05$).

A continuación, se realizó un análisis de los parámetros fotosintéticos en hojas adaptadas a la luz (estado estacionario) para las líneas UTR-FGF y la línea NT. En el caso de la línea UTR-GUS, la cantidad de réplicas biológicas no resultó suficiente para realizar los análisis estadísticos. Teniendo en cuenta que la línea UTR-GUS es indistinguible fenotípicamente de la no transformada y la ausencia de diferencias significativas en el parámetro de F_v/F_m entre estas líneas, consideramos que es posible continuar con los análisis excluyendo esta línea. En un futuro, se repetirá el análisis con mayores réplicas de la línea UTR-GUS.

Las mediciones en hojas adaptadas a la luz ($100\text{--}300\ \mu\text{mol s}^{-1}\text{ m}^{-2}$) se realizaron con plantas crecidas en condiciones de fotoperíodo normal (16 horas de luz) y en la franja horaria de capacidad fotosintética de estado estacionario estable (entre las 3 y 12 hs del ciclo diurno). En la figura 23 se muestran los resultados obtenidos para la medición de parámetros de fluorescencia de estado estacionario.

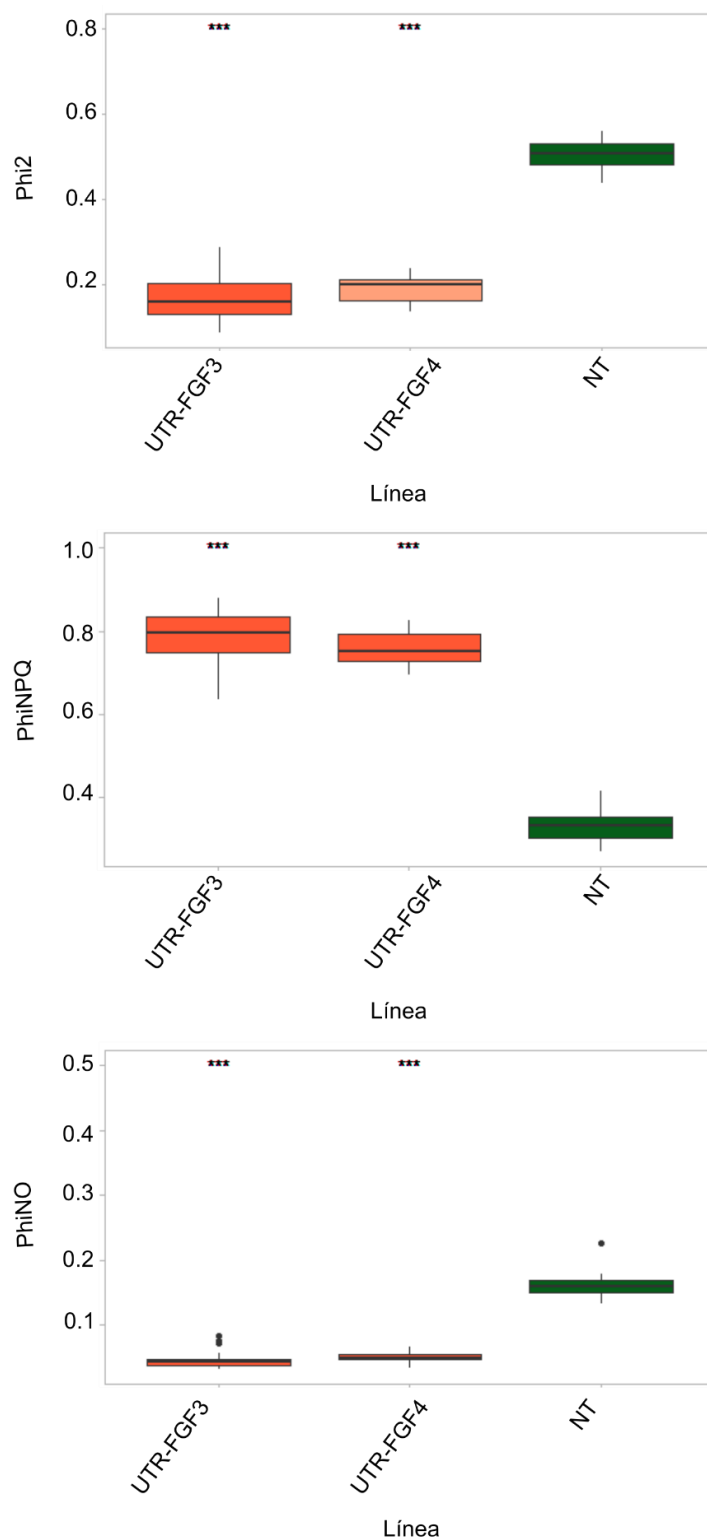


Figura 23. Determinación de parámetros fotosintéticos en estado estacionario. Plantas de tabaco no transformadas (NT) y las líneas UTR-FGF fueron crecidas en tierra por 6 y 9 semanas, respectivamente. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a la línea NT.

Se observó una reducción significativa de la eficiencia del PSII (ϕ PSII) en las líneas UTR-FGF respecto a las plantas NT, lo que indicaría un menor porcentaje de energía absorbida destinada a fotoquímica y una menor eficiencia en el transporte de electrones. En línea con esto, se observó un aumento significativo del rendimiento cuántico asociado al *quenching* no fotoquímico (ϕ NPQ), asociado a la liberación de energía por calor. El parámetro ϕ NO (*quenching* no fotoquímico), relacionado con pérdidas de energía por fotoinhibición, se encontró disminuido en las líneas UTR-FGF.

6.3 Efecto de la intensidad lumínica sobre el fenotipo clorótico de las líneas UTR-FGF

Se sabe que la intensidad lumínica puede afectar el contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas (Janeeshma et al., 2022). Diversos estudios mostraron que plantas transplastómicas con un fenotipo clorótico presentaron una reversión de su fenotipo al disminuir la intensidad lumínica (Ahmad et al., 2012a; Lentz et al., 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos evaluar cuál es el efecto de la intensidad lumínica sobre el fenotipo de clorosis en las líneas UTR-FGF.

Se midió el contenido total de clorofila en plantas cultivadas *in vitro* durante 7 semanas a intensidades de luz de 65-70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (normal) o 8-11 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (sombra). En concordancia con los resultados previos, en condiciones lumínicas normales los niveles de clorofila total en las líneas UTR-FGF resultaron significativamente menores en comparación a las plantas NT o las líneas UTR-GUS (figura 24). La reducción de los niveles de clorofila en las líneas UTR-FGF respecto a las NT se mantuvo también en condiciones de baja luz.

Se comparó dentro de una misma línea cómo variaron los niveles de clorofila en función de la intensidad lumínica. Para las cuatro líneas analizadas, los niveles de clorofila disminuyeron significativamente en condiciones de baja luz comparada con la misma línea en condiciones lumínicas normales (figura 25). Esto demuestra que la disminución en la intensidad lumínica no permite revertir el fenotipo clorótico en las líneas UTR-FGF.

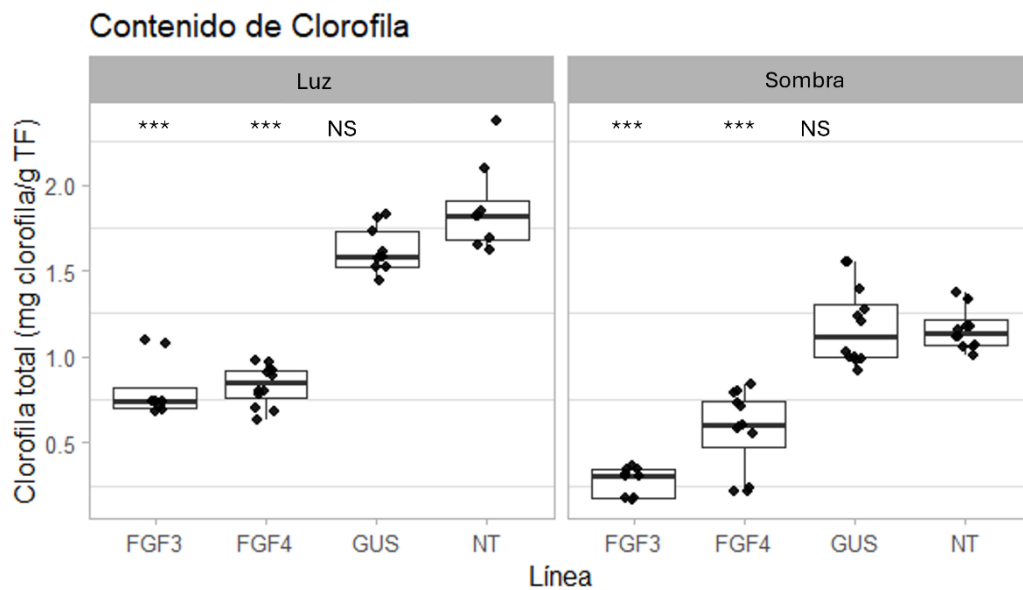


Figura 24. Análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos para distintas líneas transplásticas o plantas NT. Las plantas se crecieron *in vitro* durante 7 semanas en condiciones de luz normal ($65-70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) o de sombra ($8-11 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) y se midió el contenido de clorofila total. Se muestra el *boxplot* del contenido de clorofila para las distintas líneas en condiciones de luz (izquierda) y en condiciones de oscuridad (derecha). Los asteriscos muestran diferencias significativas respecto de la línea NT ($p=0,05$).

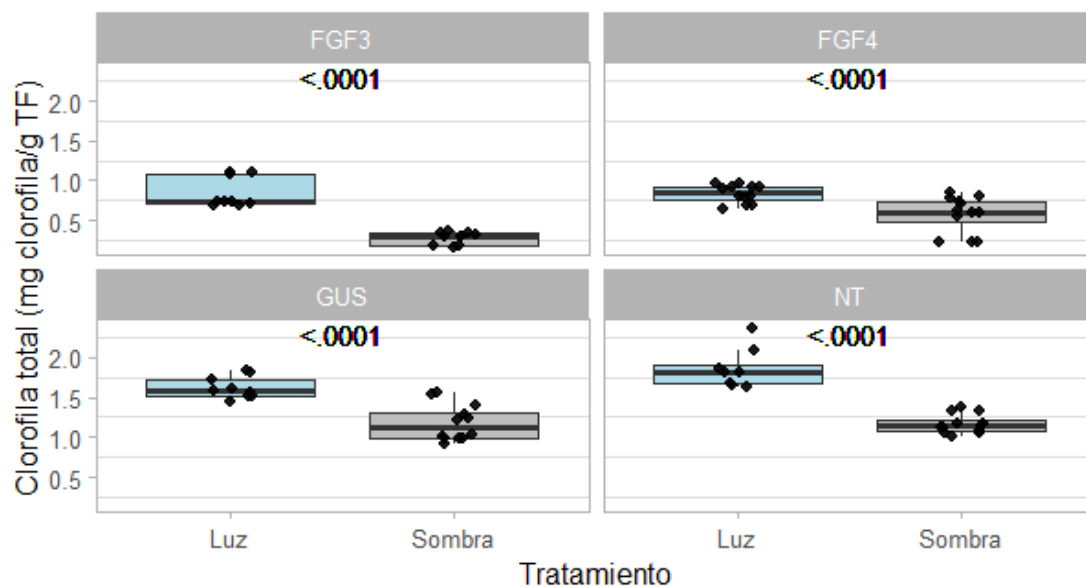


Figura 25. Efecto de la intensidad de luz en el contenido de clorofila para cada línea. *Boxplot* del contenido de clorofila en condiciones de luz ($65-70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) y sombra ($8-11 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) para cada línea. El análisis estadístico se realizó mediante un modelo lineal y una comparación de medias entre los tratamientos dentro de cada línea. Se muestra el p valor de cada comparación.

Por otro lado, se analizó la relación entre clorofila *a* y clorofila *b* bajo las distintas condiciones lumínicas para cada línea. La relación entre los tipos de clorofila varía en función de las condiciones lumínicas para maximizar el desempeño fotosintético de las plantas. En condiciones de baja luz, las plantas acumulan una mayor cantidad de clorofila *b* y hay un aumento en la densidad de los complejos LHCs (Leong y Anderson, 1984).

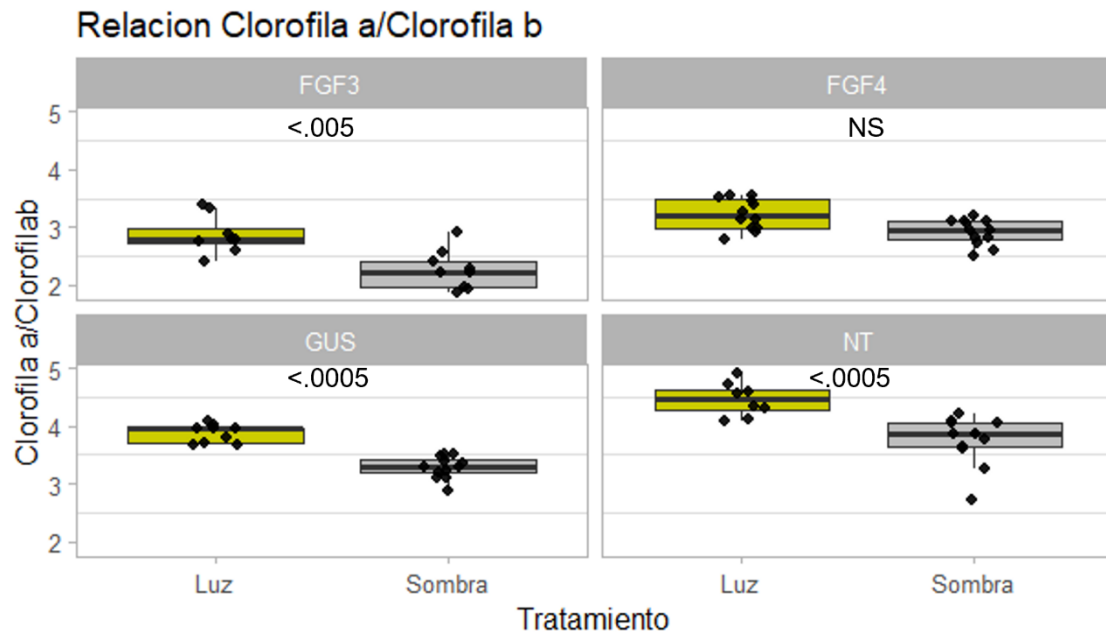


Figura 26. Efecto de las condiciones lumínicas en la relación clorofila *a/b* para cada línea. *Boxplot* de la relación clorofila *a/b* en condiciones de luz normal ($65-70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) y sombra ($8-11 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) para cada línea. El análisis estadístico se realizó mediante un modelo lineal y una comparación de medias entre los tratamientos dentro de cada línea. Se muestra el *p* valor de cada comparación.

De acuerdo a lo esperado, se observó una disminución significativa en la relación de clorofila *a/b* en plantas NT y UTR-GUS sometidas a baja intensidad lumínica (figura 26). La misma tendencia se observó para las líneas UTR-FGF. Estos resultados sugieren que las líneas UTR-FGF presentan mecanismos de regulación de pigmentos fotosintéticos en respuesta a luz similares a las plantas salvajes. En conjunto, los resultados sugieren que la disminución en los pigmentos fotosintéticos en las plantas UTR-FGF podría deberse a fallas en el desarrollo del cloroplasto y no a un efecto fotoinhibitorio asociado a la intensidad lumínica.

Capítulo 2:

Expresión transitoria en plantas de *Nicotiana benthamiana*

1. Diseño de un sistema de clonado modular para el direccionamiento de proteínas heterólogas a distintos compartimentos subcelulares

La acumulación de proteínas recombinantes en distintos compartimentos subcelulares constituye una estrategia útil para aumentar sus niveles de acumulación y el rendimiento de un sistema de expresión (Venkataraman et al., 2023). El entorno de los distintos compartimentos subcelulares tiene incidencia sobre la estabilidad de una proteína recombinante, su plegamiento y las modificaciones post traduccionales. La elección del compartimento óptimo para la acumulación de una proteína recombinante dependerá a su vez de las características bioquímicas de la proteína de interés, y en consecuencia debe explorarse para cada caso particular. Con el objetivo de estudiar la acumulación de rhFGFb en distintos compartimentos subcelulares, diseñamos una estrategia de clonado basado en el método de Golden Gate Assembly (Engler et al., 2008) que permite fusionar proteínas a distintas señales de localización subcelular. Para ello, realizamos una serie de modificaciones sobre el vector de expresión pEAQ-HT-GFP (Sainsbury et al., 2009; Sainsbury y Lomonosoff, 2008). Este vector posee las secuencias regulatorias no traducibles 5'UTR y 3'UTR derivadas del *Cowpea Mosaic Virus* (CPMV RNA-2). A su vez, el vector incorpora en la región de T-DNA al gen correspondiente a la proteína viral supresora del silenciamiento P19 (Lakatos et al., 2004), que permite obtener mayores niveles de acumulación de proteínas recombinantes (figura 27A).

La adaptación del vector comprendió la incorporación de una secuencia *polylinker* con sitios de Bsal necesarios para el clonado. A su vez, se introdujeron mutaciones silenciosas en la secuencia codificante correspondiente a P19 para eliminar los sitios de reconocimiento de la enzima Bsal (P19*). A partir de estas modificaciones, se obtuvo el vector pEAQ-Golden (figura 27B). El detalle de los pasos necesarios para la construcción del vector pEAQ-Golden se describen en el *Anexo A.1*.

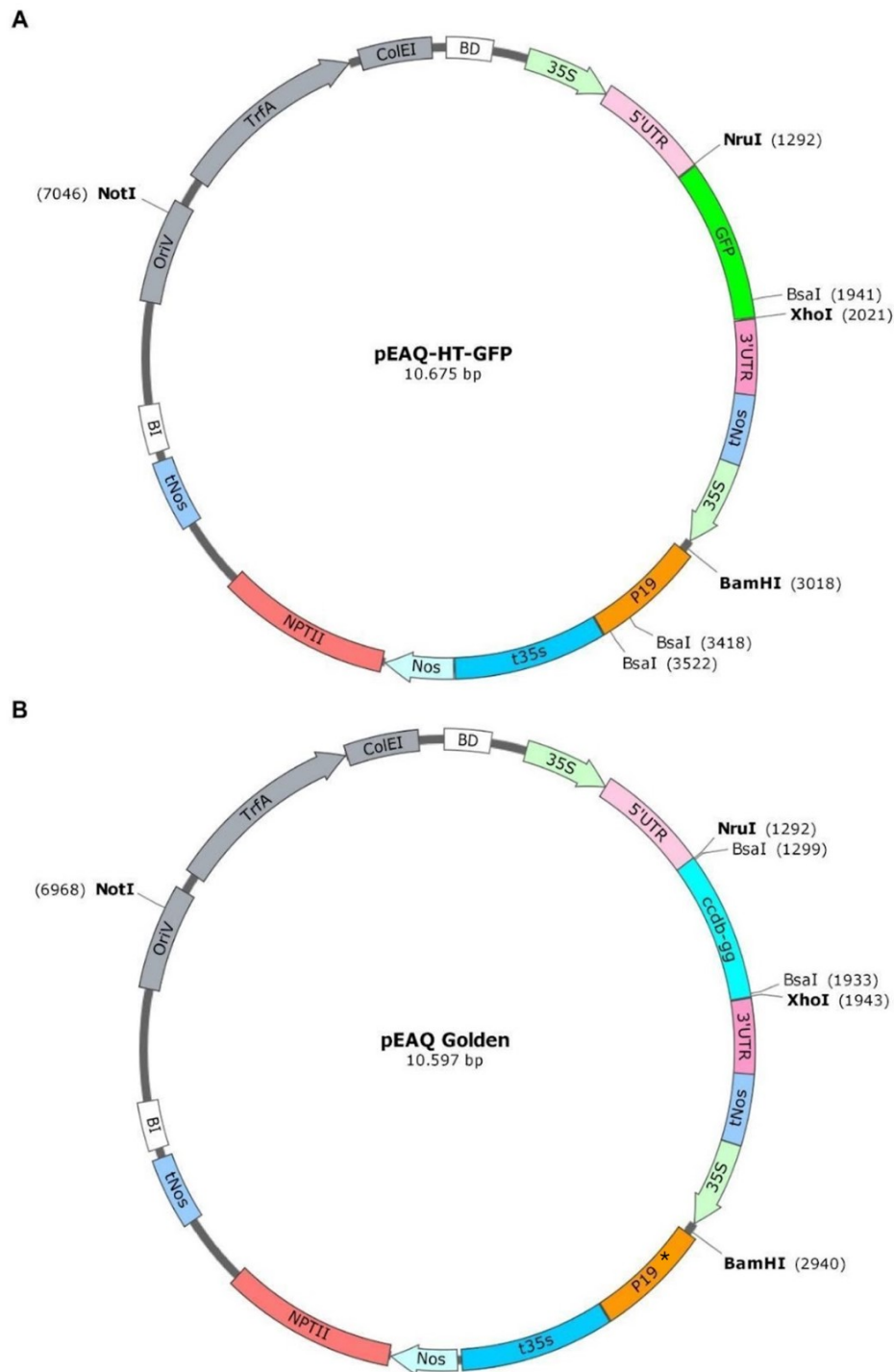


Figura 27. Vectores para expresión transitoria en *N. benthamiana*. Esquema de los vectores pEAQ-HT-GFP (A) y pEAQ-Golden (B). Se señalan los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción relevantes para los clonados. **BD, BI:** bordes derecho e izquierdo del ADN-T. **Promotor 35S:** Promotor constitutivo fuerte del Virus del Mosaico del Coliflor; **5'UTR y 3'UTR:** secuencias regulatorias no traducibles; **tNos:** secuencia terminadora del gen de nopalina sintetasa; **GFP:** secuencia codificante de la proteína fluorescente verde; **P19:** gen de supresión de silenciamiento viral. **P19*:** secuencia P19 sin sitios de reconocimiento para BsaI; **NPTII:** gen de resistencia al antibiótico kanamicina. **OriV:** origen de replicación pRK2; **TrfA:** locus esencial para replicación; **ColEI:** origen de replicación pBR322.

A continuación, diseñamos los módulos correspondientes a las distintas señales de localización subcelular, incorporando los sitios de restricción Bsal y las bases adecuadas para generar extremos 5' libres compatibles para el clonado direccional (Anexo A, sección 2). En la figura 28 se muestra un esquema del sistema de clonado para la fusión de proteínas a las distintas señales de localización.

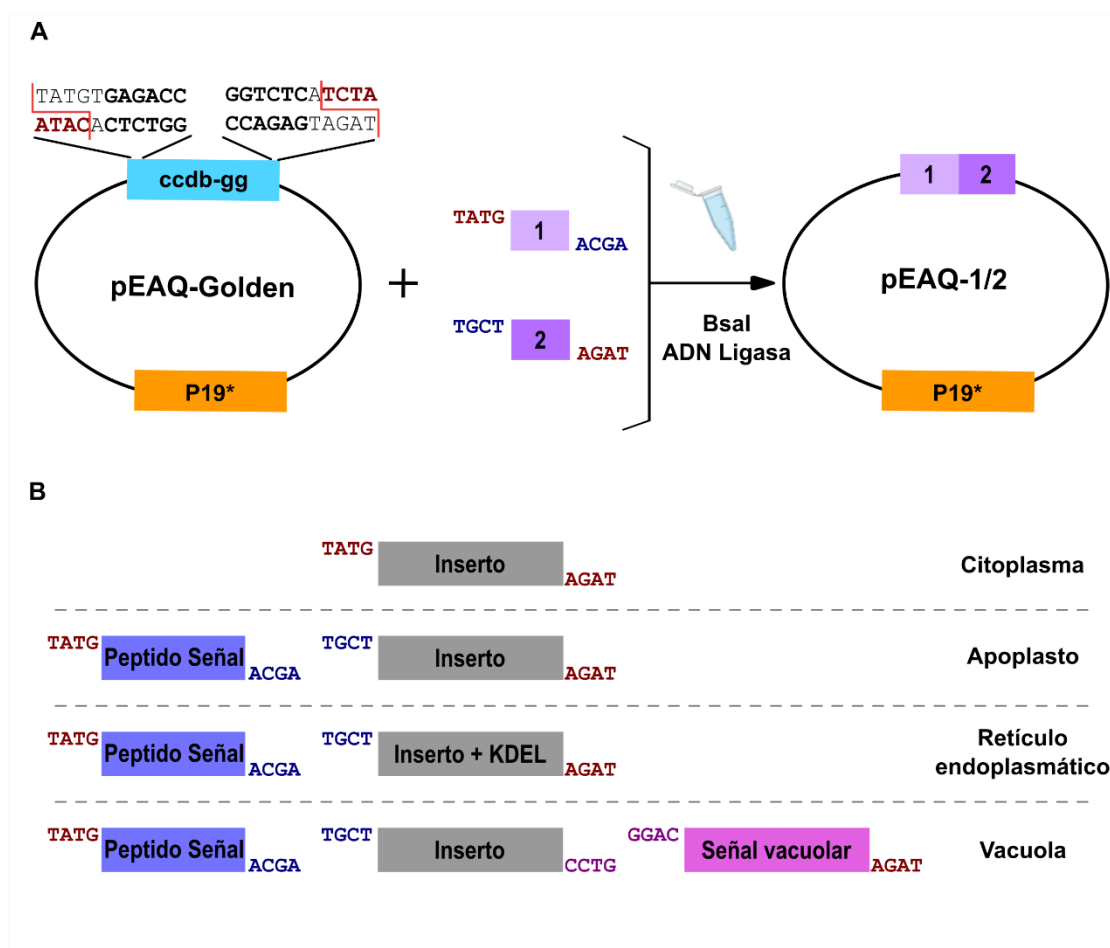


Figura 28. Esquema de la estrategia de clonado para el direccionamiento de proteínas de interés a distintas localizaciones subcelulares. (A) Representación esquemática del clonado de dos secuencias teóricas (1 y 2) en el vector pEAQ-Golden. Se muestran los sitios de reconocimiento de Bsal (negrita) y los extremos 5' libres. (B) Diseño de los módulos para la generación de proteínas de fusión con distinta localización subcelular. Se muestran las combinaciones de secuencias señal e inserto y los extremos 5' libres diseñados para el clonado direccional.

Para verificar la funcionalidad de la proteína P19* codificada en el vector pEAQGolden, analizamos si su expresión es capaz de complementar la actividad de una proteína P19 mutada (Δ P19). Para ello utilizamos el vector pEAQ- Δ P19-GFP generado

previamente en el laboratorio por el Dr. Federico E. Alfano; el cual posee una mutación puntual del gen P19, generando una proteína no funcional. Realizamos un ensayo de co-infiltración del vector pEAQ- Δ P19-GFP con los vectores pEAQ-Golden o pEAQ- Δ P19-GFP. Como control positivo, realizamos una co-infiltración de pEAQ- Δ P19-GFP y el vector pBIN-P19 que porta un gen P19 funcional (Vogler et al., 2008). Al cabo de 5 días post-infiltración se analizó la expresión de GFP observando la fluorescencia emitida al iluminar las hojas con luz UV (figura 28).

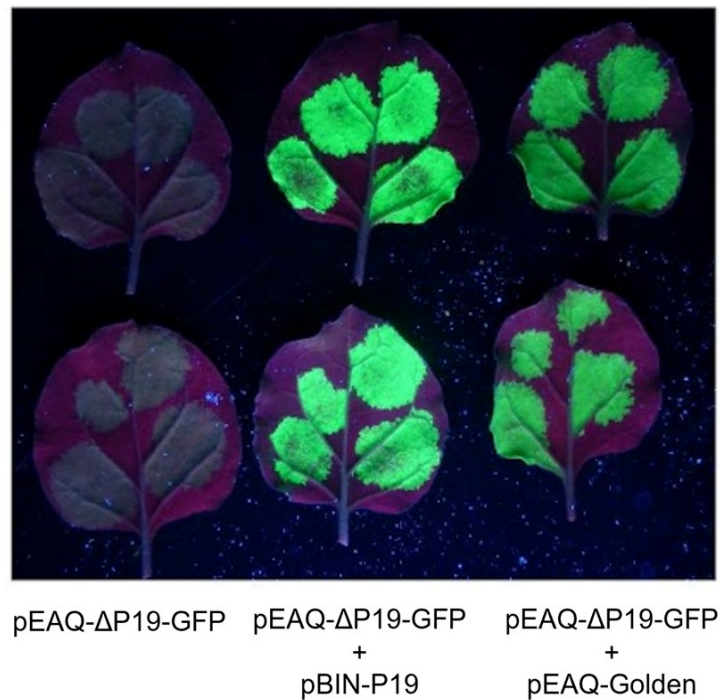


Figura 29. Chequeo de funcionalidad de P19* por complementación. Se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con los distintos tratamientos y se evaluó la fluorescencia de la proteína GFP irradiando con luz UV (365nm). Se muestran fotos de la cara abaxial de las hojas a 5 días post-infiltración.

Como se visualiza en la figura 29, la fluorescencia observada para GFP en presencia de P19* (expresado a partir del vector pEAQ-Golden) fue comparable con la fluorescencia de GFP producto de la co-infiltración con el vector pBIN-P19; en ambos casos la fluorescencia resultó superior a la de las hojas infiltradas con pEAQ- Δ P19-GFP. Esto demostró que efectivamente las mutaciones introducidas para eliminar sitios BsaI no afectaron la funcionalidad de la proteína supresora P19.

2. Las señales de localización subcelular incorporadas en el pEAQ-Golden direccionaron a las proteínas de fusión a los compartimentos esperados

Para verificar el funcionamiento del vector pEAQ-Golden y el correcto direccionamiento de las proteínas expresadas, se fusionaron las señales de localización subcelular a distintas proteínas fluorescentes y se estudió su localización mediante microscopía confocal. El detalle de los clonados se muestra en el *Anexo 3.1*.

A continuación, analizamos la localización subcelular de las proteínas reporteras fusionadas a las diferentes señales mediante expresión transitoria por agroinfiltración en *N. benthamiana*. Como control, se co-infiltraron cepas de *A. tumefaciens* transformadas con plásmidos que permiten la expresión *in planta* de proteínas de fusión marcadoras de localización subcelular previamente caracterizadas, con fluorescencias compatibles. A los 3 días post-infiltración analizamos la localización subcelular mediante microscopía confocal (figura 30).

En primer lugar, se evaluó la expresión de una versión de GFP citoplasmática (pEAQ-GFP-Cit) que no se encuentra fusionada a ninguna señal de localización. Observamos que GFP mostró localización núcleo/citoplasma, que co-localizó con una proteína roja fluorescente (RFP) expresada a partir del vector EV-RFP. En el caso de la versión que permite direccionamiento al apoplasto (pEAQ-GG-GFP-Ap), observamos co-localización parcial con el marcador de apoplasto RFP-Ap. En cuanto a la proteína GFP con señal de retención en retículo endoplasmático (pEAQ-GG-GFP-KDEL), observamos acumulación de señal alrededor del núcleo y en una disposición reticular, típica de esta localización subcelular, que coincidió con la localización visualizada para el marcador RFP-KDEL.

Por último, el patrón de fluorescencia observado para la expresión de la proteína pEAQ-GG-mKO-Vac coincide con el esperado para la marcación de la vacuola central según lo descrito por Hunter *et al* (Hunter et al., 2007). A su vez, la proteína mKO-Vac no co-localiza con la versión de GFP citoplasmática (pEAQ-GFP-Cit). Estos resultados corroboran el correcto direccionamiento de las proteínas fusionadas a la señal vacuolar.

El análisis de microscopía confocal en conjunto con las predicciones *in silico* (Anexo A.4) permiten corroborar que las señales de direccionamiento utilizadas son adecuadas para dirigir la acumulación de proteínas a los compartimentos elegidos.

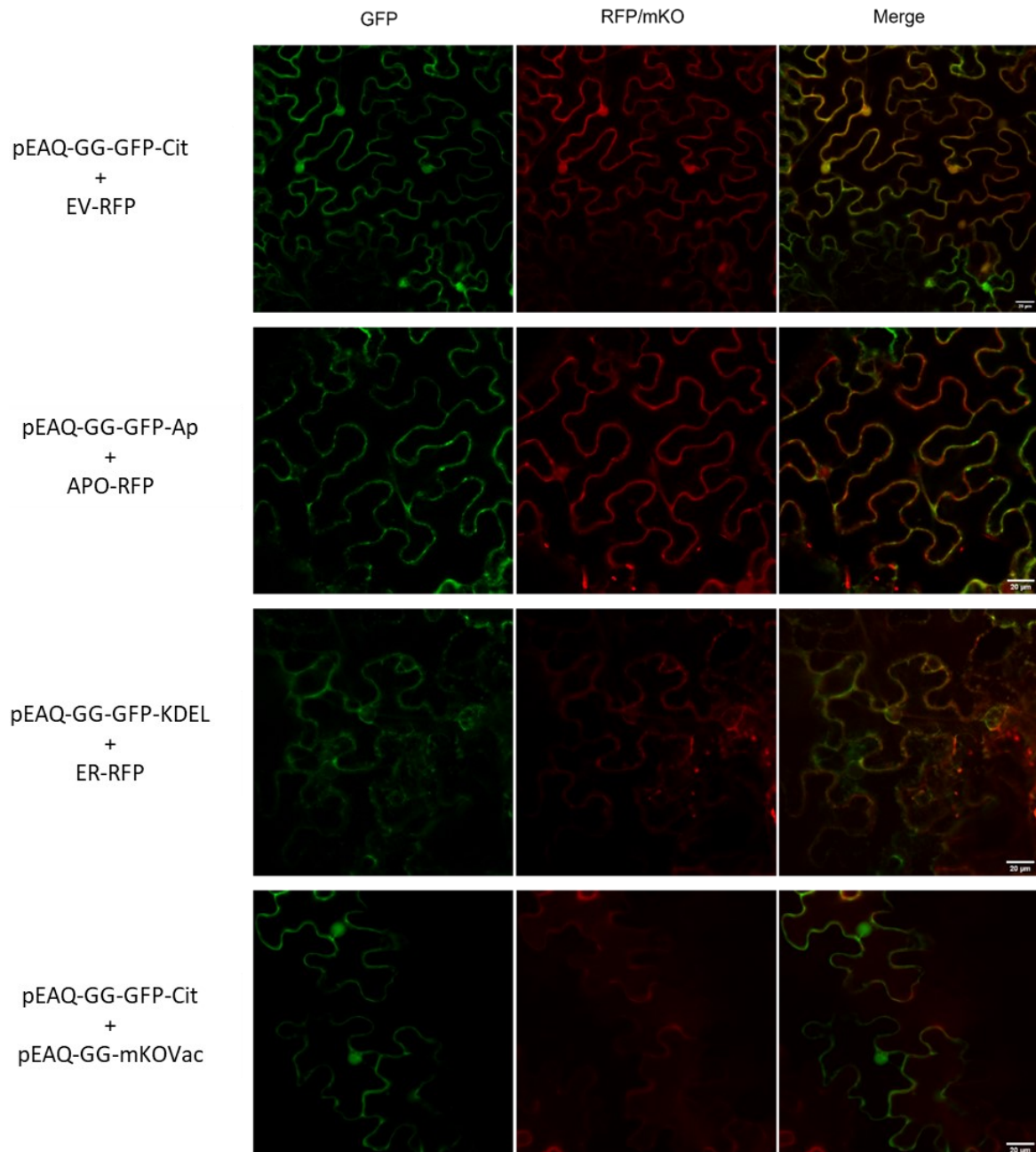


Figura 30. Validación del vector pEAQ-Golden y las señales de localización subcelular. Se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal (aumento 40X) de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las distintas construcciones (4 d.p.i). **pEAQ-GG-GFP-Cit:** GFP citoplasmático; **pEAQ-GG-GFP-Ap:** GFP apoplástico; **pEAQ-GG-GFP-KDEL:** GFP reticular; **pEAQ-GG-mKOVac:** proteína mKO vacuolar. Se utilizaron marcadores de localización subcelular caracterizados; **EV-RFP:** RFP sin señales de localización (muestra localización núcleo-citoplasma); **APO-RFP:** RFP apoplástico; **ER-RFP:** RFP reticular.

3. El apoplasto, el retículo endoplasmático y la vacuola son compartimentos adecuados para expresar rhFGFb

Para obtener las variantes de rhFGFb con distinta localización subcelular, sub-clonamos en el vector pEAQ-Golden las distintas versiones de la proteína rhFGFb fusionada a señales de localización: rhFGFb con localización apoplástica (pEAQ-GG-FGF-Ap), localización reticular (pEAQ-GG-FGF-KDEL) y localización vacuolar (pEAQ-GG-FGF-Vac) (de acuerdo a lo esquematizado en la figura 28 y *Anexo sección 3.2*). El clonado de rhFGFb con localización citoplasmática se realizó en el vector pEAQ-HT, según lo especificado en el *Anexo 3.2*.

Para determinar las condiciones óptimas para la expresión transitoria de rhFGFb se evaluaron distintos parámetros que influyen en este sistema, a saber: densidad óptica del cultivo de *A. tumefaciens* y días post-infiltración. Como control negativo se realizó la infiltración con una suspensión de *A. tumefaciens* sin transformar.

En primer lugar, evaluamos el efecto de la densidad óptica del cultivo sobre la acumulación de rhFGFb, a un tiempo fijo (5 días post-infiltración). El ensayo se realizó comparando los tratamientos D.O₆₀₀ de a pares y agroinfiltrando cada tratamiento en la mitad de una misma hoja, de forma tal de minimizar el efecto de la fisiología de la hoja en la medición. Como se observa en la figura 31A, el nivel de acumulación de la proteína recombinante aumentó conforme aumentó la densidad óptica del cultivo. Se obtuvieron resultados comparables tomando las muestras a los 3 días post-infiltración.

Por otro lado, se analizaron los niveles de acumulación de la proteína recombinante en función de los distintos días post-infiltración, partiendo de cultivos con densidades ópticas de 0,8 y 1,2. Este análisis demostró que los mayores niveles de rhFGFb se alcanzan a los 7 días post-infiltración, independientemente de la densidad óptica inicial (figura 31B).

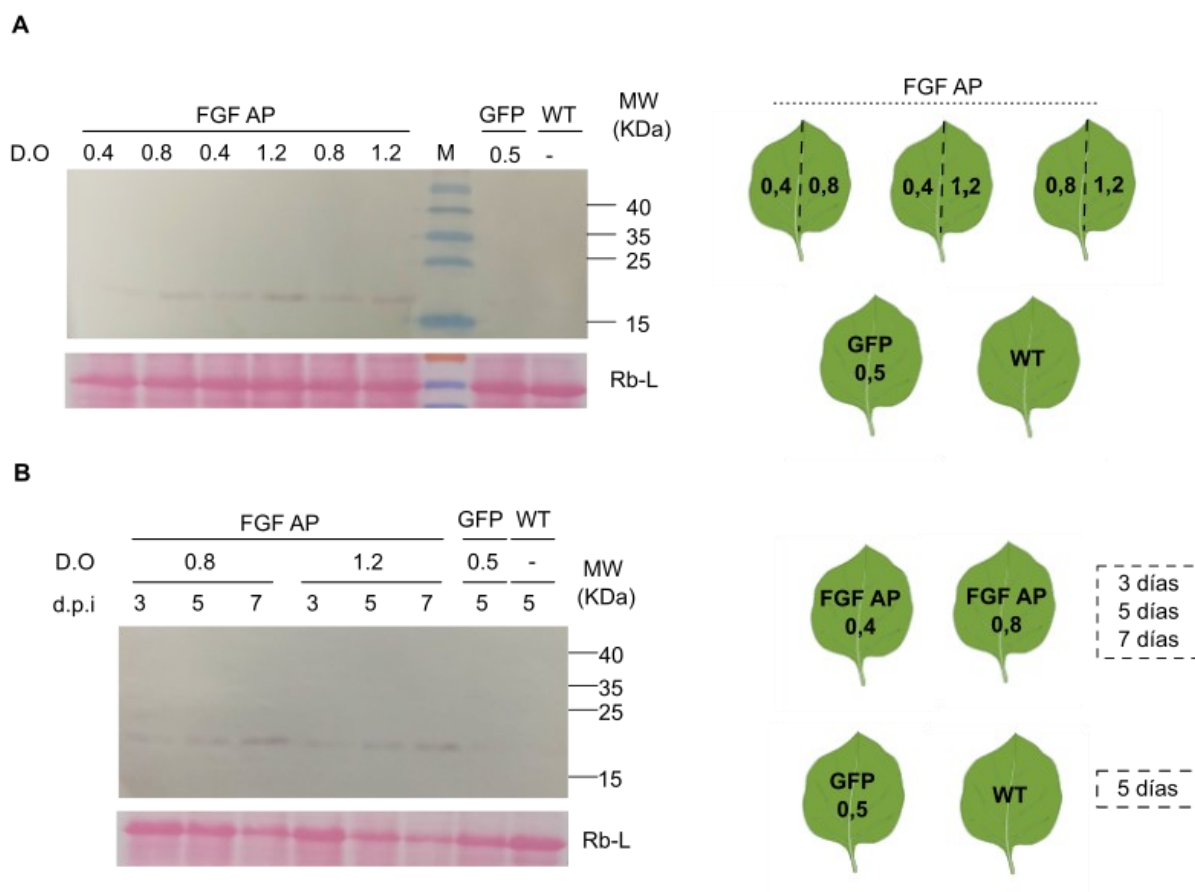


Figura 31. Análisis de condiciones de agroinfiltración para la expresión transitoria de rhFGFb apoplástico. Se analizaron mediante *western blot* muestras de proteínas totales extraídas de hojas agroinfiltradas bajo distintas condiciones experimentales. (A) Acumulación de rhFGFb en función de la densidad óptica. (B) Acumulación de rhFGFb en función de los días post-infiltración. Se reveló utilizando un anticuerpo anti-HIS. **D.O:** densidad óptica; **d.p.i:** días post-infiltración (d.p.i); **FGF AP:** muestras agroinfiltradas con plásmido pEAQ-GG-FGF-Ap; **GFP:** muestras agroinfiltradas con plásmido pEAQ-GG-GFP-Cit; **WT:** muestras agroinfiltradas con *A. tumefaciens* (GV3101).

En función de estos resultados, elegimos utilizar como condiciones de agroinfiltración una densidad óptica inicial de 0,8 y tiempo de 7 días post-infiltración para los siguientes análisis. Al evaluar la expresión y acumulación de rhFGFb en los distintos compartimentos subcelulares, observamos que rhFGFb se acumuló en apoplasto, retículo endoplasmático y vacuola. Sin embargo, no se detectó acumulación de rhFGFb en el citoplasma (figura 32).

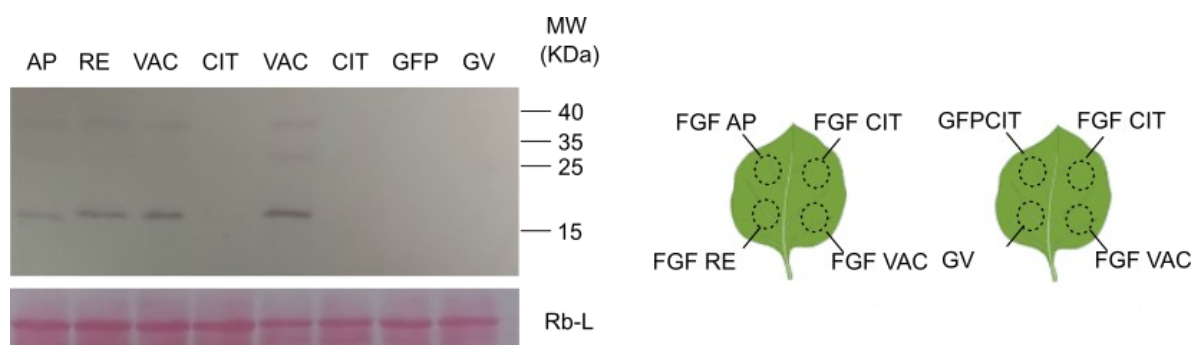


Figura 32. Comparación de la acumulación de rhFGFb en distintos compartimentos subcelulares. Se analizó por *western blot* con anticuerpo específico anti-FGF la acumulación de rhFGFb en función de la localización subcelular (7 d.p.i.). **AP:** rhFGFb apoplasto; **RE:** rhFGFb retículo endoplasmático; **VAC:** rhFGFb vacuola; **CIT:** rhFGFb citoplasma; **GFP:** control agroinfiltrado con plásmido pEAQ-GG-GFP-Cit; **GV:** Control agroinfiltrado con cepa de *A. tumefaciens* GV3101 sin transformar.

4. La expresión transitoria de rhFGFb dió como resultado bajos niveles de acumulación

Con el objetivo de obtener un rhFGFb purificado para analizar su actividad biológica, realizamos una purificación de la proteína recombinante por siguiendo el protocolo de purificación establecido en la *sección 1.4.1 (Resultados Capítulo 1)*. Sin embargo, no fue posible obtener niveles de rhFGFb detectables mediante la técnica de *western blot*. Esto podría deberse a que la cantidad de tejido procesado (3 gramos) no resultó suficiente para una correcta purificación.

Como una primera aproximación, realizamos una comparación relativa de los niveles de acumulación obtenidos para rhFGFb utilizando los dos sistemas de plantas como biorreactores analizados en esta Tesis. Analizamos por *western blot* extractos de proteínas solubles totales extraídas de hojas agroinfiltradas con la construcción pEAQ-GG-FGF-Ap ($D.O_{600}=0,8$, 7 días) y de una planta transplastómica de la línea UTR-FGF 4. Como puede observarse en la figura 33A, para una misma masa total de tejido fresco, los niveles de acumulación de la proteína recombinante son mayores en plantas transplastómicas respecto al rhFGFb apoplástico expresado de forma transitoria en *N. benthamiana*. Este resultado fue corroborado en numerosos ensayos de *western blot* utilizando anticuerpos anti-HIS, en los cuales el límite de detección no alcanzaba para poder detectar la proteína recombinante extraída de plantas agroinfiltradas.

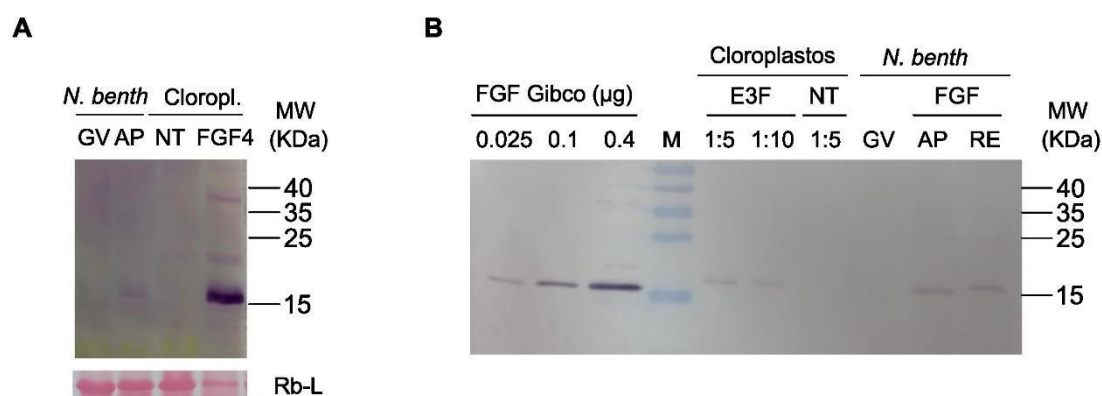


Figura 33. Análisis comparativo de la acumulación de rhFGFb en los distintos sistemas de expresión en plantas. (A) Análisis de expresión de rhFGFb. Se analizaron extractos de proteínas totales de hojas (4 mg tejido fresco). (B) Cuantificación por densitometría. Las muestras de rhFGFb obtenidas con los dos sistemas de expresión se analizaron por *western blot* con anticuerpo anti-FGF. Para cuantificar, se realizó un análisis de densitometría comparando contra una curva estándar de FGF comercial (FGF Gibco). **E3F:** Eluido 3 Filtrado de extracción de plantas transplastómicas; **NT:** extracto de plantas de *N. tabacum* no transformadas; **GV:** control de agroinfiltración con cepa de *A. tumefaciens* GV3101 sin transformar; **AP:** FGF Apoplástico; **RE:** FGF reticular; **FGF4:** planta transplastómica UTR-FGF 4.

En un análisis preliminar por densitometría se obtuvo un valor estimado de 3,5 µg rhFGFb /g Tejido fresco y 2,6 µg rhFGFb/g tejido fresco para rhFGFb apoplástico y reticular, respectivamente (figura 33B). Sin embargo, no fue posible determinar en cuál compartimento se obtuvo una mayor acumulación, dado que los valores obtenidos se encuentran dentro del mismo orden. Por otro lado, al comparar con los niveles de rhFGFb expresados en plantas transplastómicas (34 ± 2 µg rhFGFb soluble/g tejido fresco), los niveles de rhFGFb obtenidos para la expresión transitoria son significativamente menores.

En base a estos resultados, se puede concluir que es posible expresar de forma transitoria rhFGFb direccionando su acumulación al apoplasto, retículo endoplasmático y vacuola. Sin embargo, el sistema de expresión transitoria bajo las condiciones analizadas no resulta eficiente para la producción de la proteína recombinante a niveles suficientes para su purificación. Es necesario optimizar el sistema con el fin de obtener niveles adecuados para su producción, purificación y prueba de actividad biológica.

5. Análisis bioinformático de la secuencia de rhFGFb

A la hora de expresar una secuencia codificante de origen humano en plantas es importante tener en cuenta distintos factores intrínsecos de la secuencia nucleotídica que puedan afectar sus niveles de expresión. Esto implica la optimización de uso de codones, la eliminación de sitios crípticos de *splicing*, sitios alternativos de poliadenilación y señales de metilación que podrían inducir silenciamiento génico (Niederhuth y Schmitz, 2017; Reddy et al., 2020).

Para la expresión de rhFGFb en los distintos sistemas estudiados en esta Tesis, se utilizó una misma secuencia nucleotídica correspondiente a la construcción 6xHIS-TEV-FGFb. Dicha secuencia fue optimizada de forma híbrida para la expresión en *P. pastoris* y cloroplastos de *N. tabacum*, y chequeada de forma manual para *N. benthamiana*. En función de esto, formulamos la hipótesis de que el proceso de adaptación de la secuencia pudo haber sido subóptimo, ocasionando que los niveles de expresión transitoria de rhFGFb fueran menores a los esperados para este sistema. Para investigar esta hipótesis se realizaron una serie de análisis bioinformáticos que se detallan a continuación.

5.1 Verificación de la optimización de codones de la secuencia codificante hFGFb

Para evaluar la eficiencia de la optimización de codones de la secuencia utilizada en este trabajo, referida como *hFGFb* híbrida, se comparó esta secuencia con una secuencia optimizada, utilizando el software de acceso libre ExpOptimizer de NovoPro (<https://www.novoprolabs.com/tools/codon-optimization>). Este algoritmo tiene en cuenta los siguientes parámetros para la optimización: frecuencia de uso de codones, optimización de secuencia 5'UTR, regiones repetitivas de ADN, porcentaje de nucleótidos GC y estructura secundaria del ARN mensajero. Se compararon los parámetros de índice CAI y %GC antes y después de la optimización (tabla 4). Como control, se calcularon los mismos parámetros utilizando como *input* la secuencia codificante de *hFGFb* obtenida de la base de datos de NCBI (*hFGFb* no optimizada).

Secuencia	<i>hFGFb</i> no optimizada	<i>hFGFb</i> optimizada híbrida	<i>hFGFb</i> optimizada ExpOptimizer
Indice CAI	0,74	0,94	0,81
% GC	48,47%	38,24%	44.65%

Tabla 4. Comparación de los parámetros obtenidos para la secuencia de *hFGFb* con distintos tipos de optimización, utilizando el software ExpOptimizer de NovoPro.

El índice CAI (índice de adaptación de codones) pondera la frecuencia de uso de los codones de una secuencia codificante y mide el grado de adaptación de la secuencia para un dado organismo (Sharp y Li, 1987). El CAI (índice de adaptación de codones) obtenido para la secuencia optimizada ExpOptimizer resultó mayor al de la secuencia sin optimizar, pero menor al de la secuencia optimizada híbrida utilizada en este trabajo. Si se analiza el CAI del gen de la subunidad menor de Rubisco, un gen de expresión alta y constitutiva en plantas, su valor es de alrededor de 0,8 (Geyer et al., 2007). Dicho valor se encuentra más cercano al de la secuencia optimizada teórica respecto de la secuencia optimizada híbrida.

La composición genómica (%GC/AC) es relevante a la hora de la optimización de una secuencia para su expresión heteróloga debido a su incidencia en la frecuencia de uso de codones y aminoácidos para una dada especie (Knight et al., 2001). En el caso de estudio, el %GC obtenido para la secuencia optimizada ExpOptimizer fue mayor que para la secuencia optimizada híbrida. Sin embargo, ambos valores se encuentran cercanos al %GC para genes de *N. benthamiana* (42,7%), predicho en un análisis genómico realizado para esta especie (Kurotani et al., 2023).

En conjunto, los resultados muestran que la optimización de la secuencia utilizada en este trabajo es factible de ser mejorada. Sin embargo, las diferencias encontradas entre la secuencia optimizada híbrida y la optimizada ExpOptimizer no resultan suficientes para explicar los bajos niveles de expresión obtenidos.

5.2 Análisis de sitios de poliadenilación alternativos en *N. benthamiana*

Las poliadenilación está regulada por una combinación de elementos dentro del ARNm que rodean al sitio de poliadenilación, constituyendo señales complejas cuyo patrón difiere entre animales y plantas (Hu et al., 2005). Por esta razón, al expresar una

secuencia codificante de origen humano en *N. benthamiana* puede haber sitios que sean reconocidos como señales de poliadenilación alternativos.

Si bien existen algoritmos de predicción de sitios de poliadenilación en plantas a partir de secuencias genómicas (Ji et al., 2015), la disponibilidad de software de libre acceso para predecir poliadenilación en *N. benthamiana* es aún limitada. Dado que este estudio no requiere el procesamiento de un gran número de secuencias, la predicción de sitios de poliadenilación se realizó de forma manual identificando los distintos elementos de acuerdo a Hunt y Li, 2015.

Las señales de poliadenilación en plantas constan de tres elementos cis-regulatorios: un elemento FUE (*far-upstream element*), uno o más elementos NUE (*near-upstream element*) y el sitio de poliadenilación (CS). Los sitios CS están compuestos por la secuencia YA (UA/CA) y se suelen encontrar en una región rica en nucleótidos U denominada URE (Loke et al., 2005). En base a diversos reportes sobre la estructura de estos elementos para *Arabidopsis thaliana*, se elaboró el esquema general de sitios de poliadenilación presentado en la figura 34.

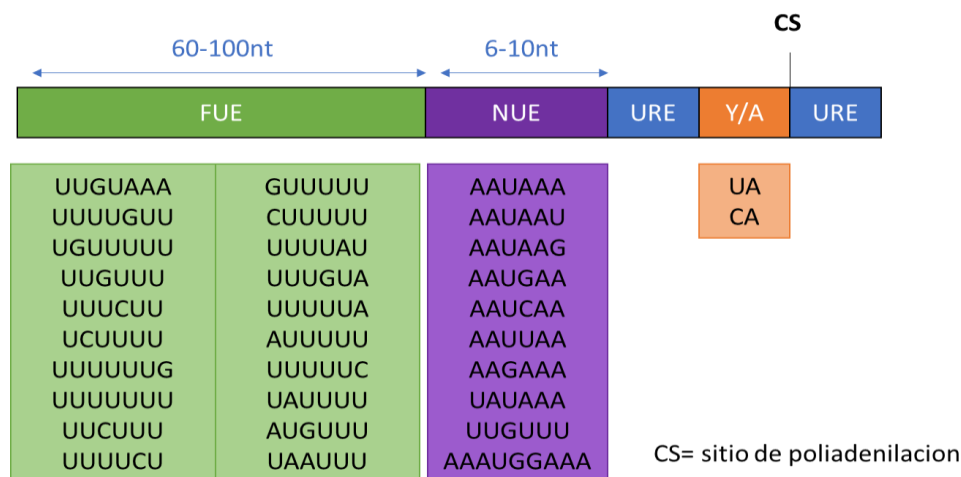


Figura 34: Esquema del sitio de poliadenilación en *A. thaliana*. Se muestran los distintos elementos con una lista de las secuencias más representativas para cada elemento. **FUE** (Far-upstream element); **NUE** (near-upstream element): puede contener la secuencia canónica AAUAAA o los otros elementos identificados en diversos trabajos (Li y Hunt, 1995; Rothnie et al., 1994; Sherstnev et al., 2012; Wang et al., 2020; Wu et al., 1994); **URE**: region rica en nucleótidos U; **CS**: sitio de poliadenilación compuestos por la secuencia Y/A.

Se analizó la secuencia codificante *hFGFb* utilizada en este trabajo (*hFGFb* optimizada híbrida) utilizando el software ape para buscar homología de la secuencia

con los distintos elementos mencionados. En primer lugar, se identificaron los potenciales NUE, encontrándose los 3 elementos detallados en la tabla 5.

Secuencia de potencial NUE	Posición en secuencia codificante (nt)	Secuencia teórica
TTGTTT	236-241	UUGUUU
AATTAA	243-248	AAUUAU
AAGAAA	375-380	AAGAAA

Tabla 5. Identificación de sitios potenciales NUE. Se muestra la secuencia nucleotídica de los potenciales NUE identificados para la secuencia *hFGFb* optimizada híbrida.

Para cada potencial NUE se analizaron las secuencias lindantes (100 nucleótidos río abajo y 20 nucleótidos río arriba) para la identificación de potenciales sitios FUE y CS. En la figura 35 se muestran los distintos elementos identificados en este análisis.

Como control de la metodología empleada, se realizó el mismo análisis sobre la secuencia optimizada ExpOptimizer. Dado que el algoritmo tiene en cuenta los sitios de poliadenilación en plantas para la optimización, no se espera encontrar sitios de poliadenilación alternativos. Si bien se encontraron tres potenciales sitios NUE, los mismos no se acompañaron por los otros elementos estructurales de los sitios de poliadenilación.

Según los análisis presentados, se concluye que en la secuencia *rhFGFb* utilizada en este trabajo podrían existir dos sitios reconocidos como señales de poliadenilación. La presencia de estas señales podría estar interfiriendo en el correcto procesamiento del mRNA *in vivo* resultando en los bajos niveles de expresión de la proteína recombinante en *N. benthamiana*.

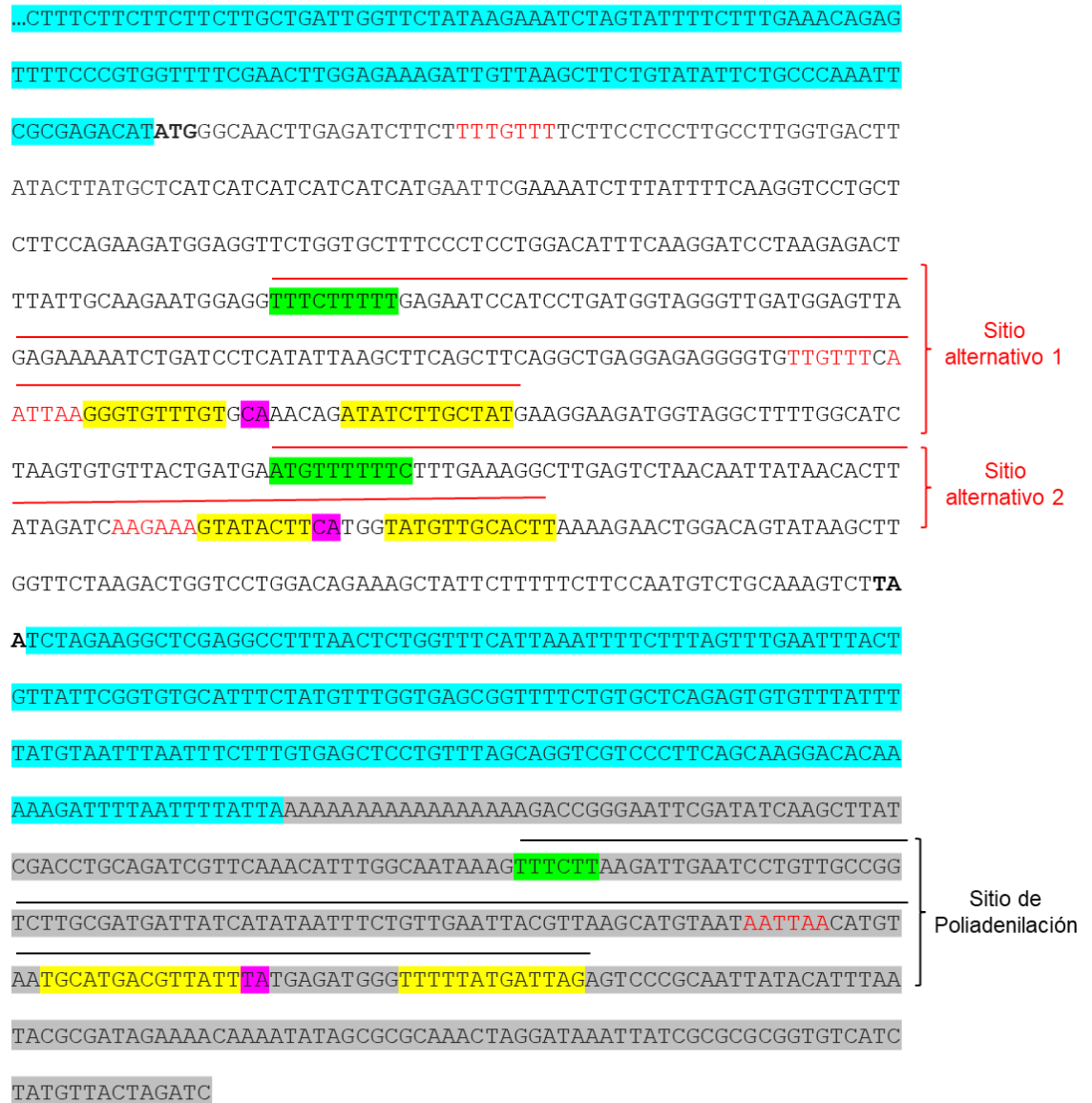


Figura 35: Análisis de sitios alternativos de poliadenilación. Se muestra el casete de expresión del transgen *FGF-Ap* (violeta) con las secuencias 5' y 3' UTR (resaltado celeste) y la secuencia terminadora del gen *tNos* (resaltado gris). Se señalan los elementos identificados de las señales de poliadenilación: NUE (letras rojas), FUE (resaltado verde), URE (resaltado amarillo) y el sitio de poliadenilación CS (resaltado violeta). Se identificó la señal de poliadenilación propia del terminador *tNos*, y dos potenciales sitios alternativos de poliadenilación.

Capítulo 3:

Expresión de factores de crecimiento recombinantes en *Pichia pastoris*

1. Construcción de los vectores de expresión pPIC_FGFb y pPIC_BMP4

A partir de la base de datos de NCBI se obtuvieron las secuencias codificantes de las proteínas hFGFb (NG_029067.1) y hBMP4 (NG_009215.1). Tomando como referencia las secuencias aminoacídicas de las proteínas comerciales, se seleccionó en cada caso la región codificante correspondiente a las proteínas maduras, luego del procesamiento del propéptido. Las secuencias se optimizaron en su uso de codones a fin de mejorar el índice CAI (índice de adaptación de codones), según las tablas de uso de codones otorgadas por el Kazusa DNA Research Institute (<https://www.kazusa.or.jp/codon/>). Para la proteína rhFGFb, realizamos una optimización híbrida entre el uso de codones para *P. pastoris* y cloroplastos de *N. tabacum*, a fin de evaluar su expresión en ambos sistemas. En cambio, la proteína hBMP4 fue optimizada únicamente para *P. pastoris* ya que al ser una proteína glicosilada, su expresión en cloroplastos no fue estudiada.

Las secuencias codificantes de ambos factores de crecimiento se sintetizaron incorporando en el extremo 5' y en marco continuo de lectura, la secuencia que codifica el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV del tobacco etch virus (ENLYFQ\). A su vez, el transgen *hFGFb* se sintetizó fusionado a un tracto de 6 histidinas N-terminal para su posterior clonado en el vector de cloroplastos. En ambos casos, se incorporaron los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI y XbaI flanqueando los casetes codificantes TEV-hFGF y TEV-hBMP4 (Figuras 36A y 37A). Las secuencias codificantes de la fusión TEV-hFGFb y TEV-hBMP4 (suministradas en un plásmido pUC), se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI y se sub-clonaron en los sitios EcoRI y AvrII (compatible con XbaI) de los vectores de expresión pPIC9NHIS y pPIC9KNHIS, respectivamente, para obtener los vectores pPIC_FGFb (Figura 36B) y pPIC_BMP4 (Figura 37B).

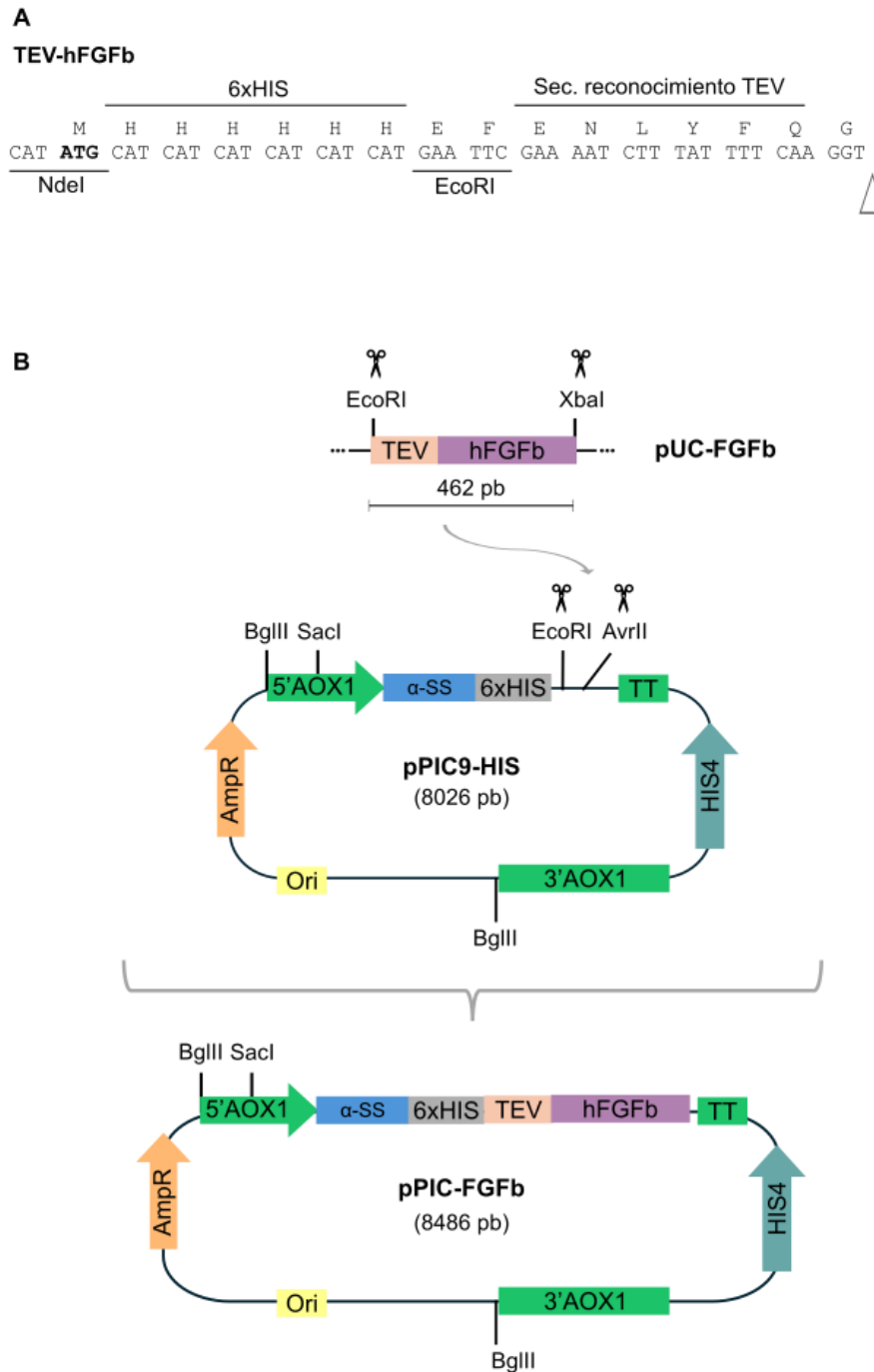


Figura 36: Obtención del plásmido pPIC_FGFb. (A) Esquema de la secuencia sintética TEV-hFGFb. La flecha indica el sitio de corte de la proteasa TEV. (B) Esquema del clonado. La secuencia TEV-hFGFb se clonó en los sitios EcoRI y AvrII del vector pPIC9-HIS. **5'AOX1 y 3AOX:** secuencias 5' y 3' del gen AOX, respectivamente; **TT:** terminador de la transcripción α ; **α -SS:** secuencia codificante de la señal de secreción del factor α de *S. cerevisiae*; **6xHIS:** etiqueta N-terminal de 6 histidinas. **HIS4:** gen de la histidinol deshidrogenasa de *P. pastoris* para la selección de levaduras recombinantes; **AmpR:** gen de resistencia a ampicilina para selección en *E. coli*.

En los vectores pPIC_FGFb y pPIC_BMP4, las secuencias TEV-hFGFb y TEV-BMP4 quedan fusionadas en 3' y en marco continuo de lectura con la secuencia codificante de la secuencia señal de secreción del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* (ss) y una secuencia codificante de 6 histidinas N-terminales (6xHIS). De esta manera las fusiones ss-6xHIS-TEV-hFGFb y ss-6xHIS-TEV-hBMP4 se encuentran bajo el control transcripcional del promotor AOX1, inducible por metanol, y del terminador (TT) del mismo gen. En ambos vectores el cassette de expresión del gen de interés y el gen de la histidinol dehidrogenasa (HIS4) quedan flanqueados por secuencias 5'y 3'no traducidas del gen AOX1 (la secuencia 5' incluye también al promotor), para su incorporación al genoma de *P. pastoris* por recombinación homóloga. El gen HIS4 servirá para la selección de los recombinantes por complementación al transformar cepas auxótrofas para histidina.

El uso de los vectores pPICNHIS o pPIC9KNHIS responde sólo a su disponibilidad en el momento de los clonados. Los vectores fueron obtenidos previamente en el laboratorio a partir de los vectores comerciales pPIC9 y pPIC9K, mediante la incorporación de la secuencia codificante del tracto de 6 histidinas, río arriba del sitio de clonado. Los vectores son equivalentes en todos sus elementos genéticos regulatorios y sitios de clonado. La diferencia entre ambos radica en que el vector pPIC9KNHIS posee el gen de resistencia a kanamicina dentro del casete a recombinar con el genoma de *P. pastoris*; este gen de resistencia permite la eventual selección de clones con inserciones múltiples del cassette de expresión (por incremento gradual de la dosis de kanamicina).

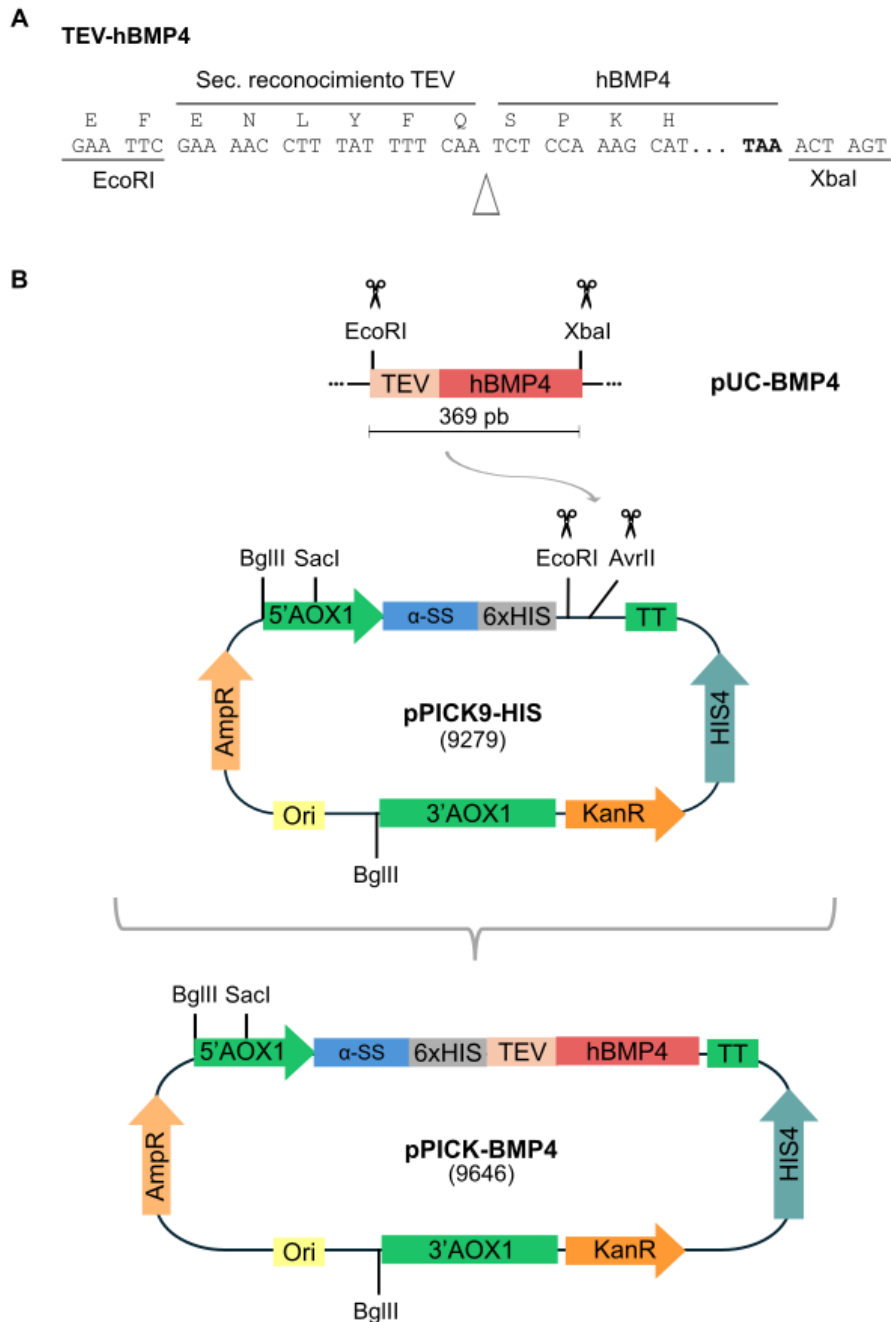


Figura 37: Obtención del plásmido pPICK_BMP4. (A) Esquema de la secuencia sintética TEV-hBMP4. La flecha indica el sitio de corte de la proteasa TEV. (B) Esquema del clonado. La secuencia TEV-hBMP4 se clonó en los sitios EcoRI y AvrII del vector pPIC9K-HIS. **5'AOX1** y **3AOX**: secuencias 5' y 3' del gen AOX, respectivamente; **TT**: terminador de la transcripción; **SS-α**: secuencia codificante de la señal de secreción del factor α de *S. cerevisiae*; **6xHIS**: etiqueta N-terminal de 6 histidinas. **HIS4**: gen de la histidinol deshidrogenasa de *P. pastoris* para la selección de levaduras recombinantes; **AmpR**: gen de resistencia a ampicilina para selección en *E. coli*. **Kan R**: gen de resistencia a Kanamicina para selección de clones de *P. pastoris* con múltiples copias.

2. Transformación de *P. pastoris* GS115 y selección de los clones recombinantes

Para la transformación de *P. pastoris*, se linealizaron los vectores pPIC_FGFb y pPIC_BMP4 por corte con las enzimas de restricción SacI o BglII y se utilizaron para transformar células competentes de *P. pastoris* de la cepa GS115 *his⁻* (Invitrogen Life Technologies). Los clones recombinantes que complementaron la auxotrofia *his⁻* se seleccionaron por crecimiento en un medio mínimo sin aminoácidos.

La inserción del cassette de expresión en el genoma de *P. pastoris* ocurre por recombinación homóloga. La misma puede darse por un evento de recombinación simple con las secuencias 5'AOX o 3'AOX del gen AOX1 endógeno, o con el gen HIS4 endógeno. Asimismo, puede ocurrir un evento de recombinación doble con las secuencias 5'AOX y 3'AOX, a través del cual el gen endógeno de AOX1 es reemplazado por el casete de expresión (Figura 38). Para verificar la inserción de las construcciones conteniendo TEV-FGFb y TEV-BMP4 realizamos un análisis por PCR de 11 y 8 clones, respectivamente, utilizando los oligonucleótidos iniciadores 5AOX_Fw y 3AOX_Rv que hibridan con las regiones no traducibles del gen AOX1 (Figura 39).

De esta manera, en los clones en los que el cassette de expresión se integró por recombinación homóloga doble, la amplificación con 5AOX_Fw y 3AOX_Rv dará como resultado un producto de 956 pb o 865 pb correspondiente a la construcción TEV-FGFb o TEV-BMP4, respectivamente. En aquellos clones en los que la inserción se produjo por recombinación simple, se observará una banda adicional correspondiente al producto de amplificación del gen AOX1 endógeno (2,2 kbp). En total obtuvimos 10 clones recombinantes para TEV-hFGFb (Figura 39) y 3 clones para TEV-hBMP4 (Figura 40).

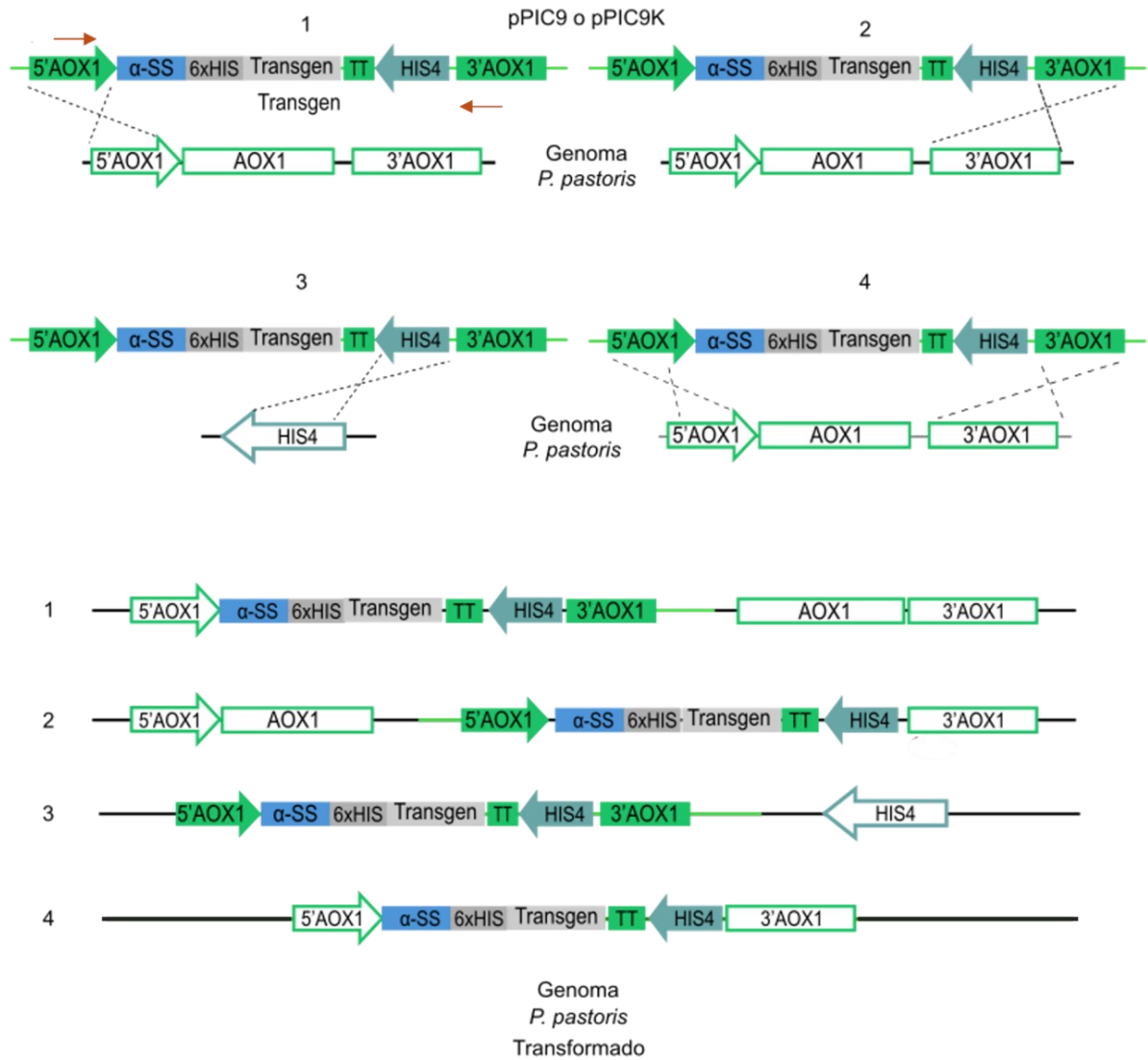


Figura 38. Integración del casete de expresión en el genoma de *P. pastoris*. El transgen puede integrarse a través de un evento de recombinación simple (1, 2 o 3) o una doble recombinación (4). Las flechas rojas indican el sitio de pegado de los oligonucleótidos iniciadores 5AOX_Fw y 3AOX_Rv.

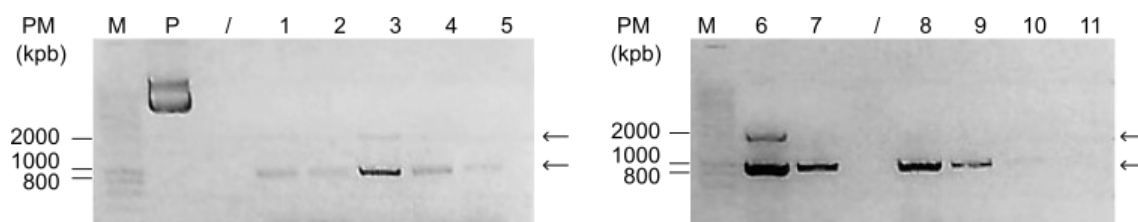


Figura 39. Verificación de la integración del transgen de rhFGFb en el genoma de *P. pastoris*. Las muestras de PCR fueron analizadas en geles de agarosa 1%. Los números representan distintos clones de *P. pastoris*: **P**: ADN plasmídico pPIC_FGFb; **/**: Calle vacía. **M**: Marcador de peso molecular *SmartLadder* (Eurogentech). Se señalan con flechas las bandas correspondientes al producto de amplificación de la construcción de hFGFb (956 pb) y del gen AOX1 endógeno (2200 pb).

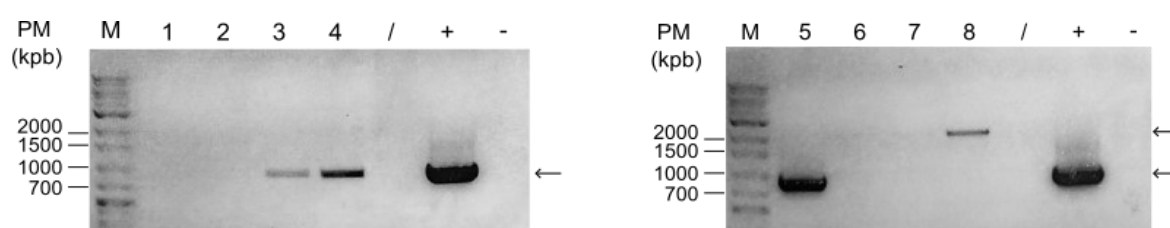


Figura 40. Verificación de la integración del transgen de rhBMP4 en el genoma de *P. pastoris*. Las muestras de PCR fueron analizadas en geles de agarosa 1%. Los números representan los distintos clones de *P. pastoris*; **+**: control positivo de PCR utilizando como templado el ADN plasmídico pPIC_BMP4. **-**: control negativo sin templado, **/**: calle vacía. **M**: Marcador de peso molecular 1kb Plus (Dongsheng Bio). Se señalan con flechas las bandas correspondientes al producto de amplificación de la construcción de hBMP4 (865 pb) y del gen AOX1 endógeno (2200 pb).

3. Ensayos de expresión de rhFGFb y rhBMP4

Para realizar una primera prueba de expresión de la proteína recombinante, seleccionamos clones transformados con cada casete de expresión TEV-FGFb, clones 3 y 8; TEV-BMP4 clones 3 y 5. Se utilizaron condiciones de cultivo puestas a punto previamente en el laboratorio para otras proteínas recombinantes producidas en *P. pastoris* (Campos et al., 2016; Niederhaus et al., 2018). El protocolo de producción de proteínas recombinantes comprende dos fases; una primera fase de proliferación, en la cual se crecen las células en un medio complejo con glicerol como fuente de carbono (BMGY), para favorecer la obtención de biomasa celular y una segunda etapa que comprende la fase de inducción, en la cual se cultivan las células en medio mínimo (BMMY) y se utiliza metanol como fuente de carbono e inductor de la expresión de las proteínas recombinantes (figura 41).

La expresión se realizó durante 4 días a partir de un cultivo de $DO_{600} = 10$ en medio BMMY utilizando metanol como fuente de carbono e inductor (Materiales y métodos, y figura 41). Se tomaron muestras cada 24 horas separando el sobrenadante de cultivo de las células y se analizó la presencia de las proteínas recombinantes mediante ensayos de *western blot* revelando con un anticuerpo anti-HIS. Ninguna de las proteínas recombinantes pudo detectarse en los sobrenadantes de cultivo.

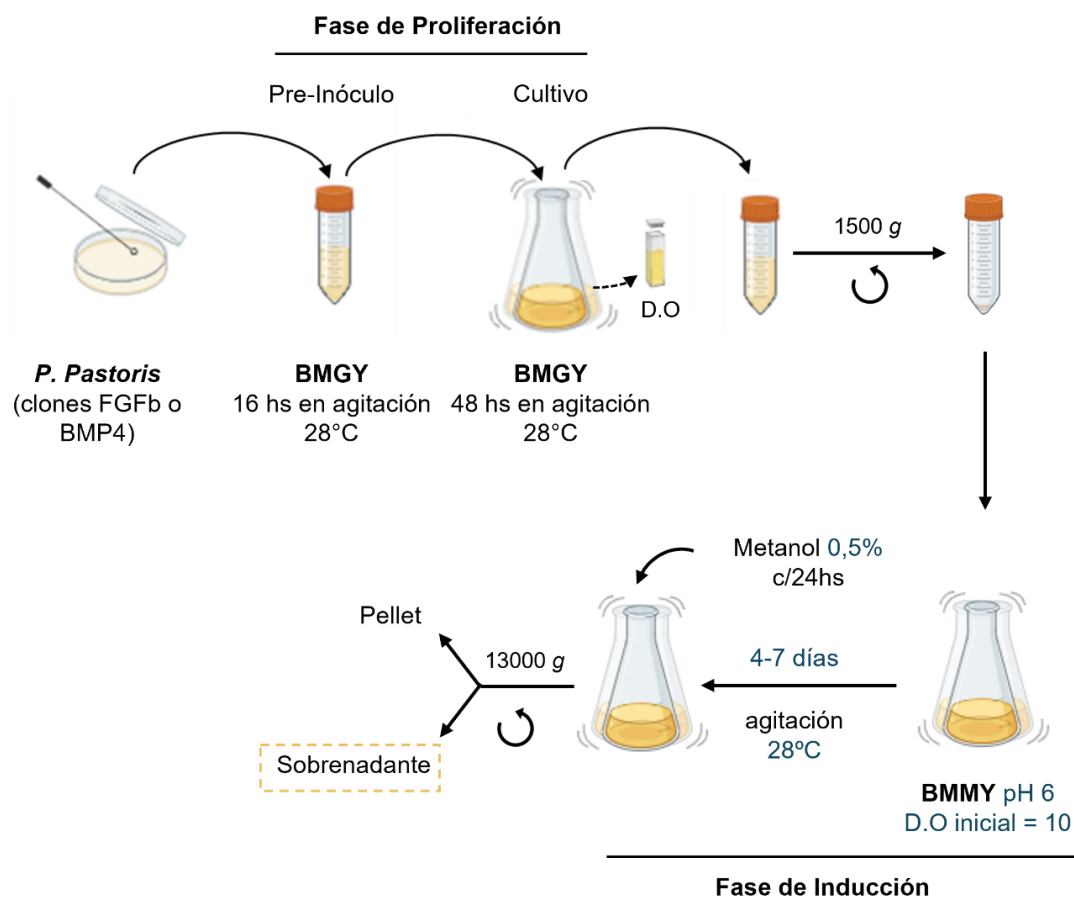


Figura 41: Esquema de producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. En azul se muestran las variables del protocolo de inducción que fueron modificadas en las distintas pruebas. Figura armada con Biorender.

En el caso de los clones transformados con TEV-hFGFb, los extractos celulares del día 4 mostraron la presencia de una banda específica de entre 30 y 58 KDa (figura 42). Dado que esta banda muestra un peso molecular mayor al esperado para HIS-TEV-hFGFb (18 kDa), se consideró que podría ser alguna forma aberrante de la proteína que no fue secretada correctamente.

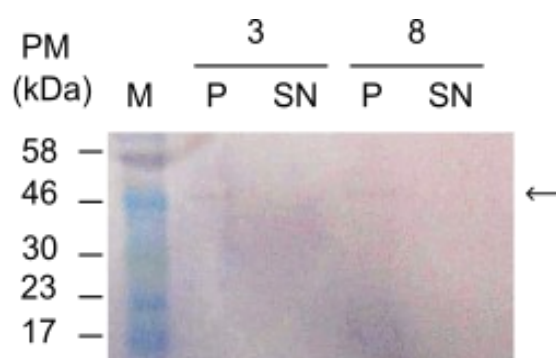
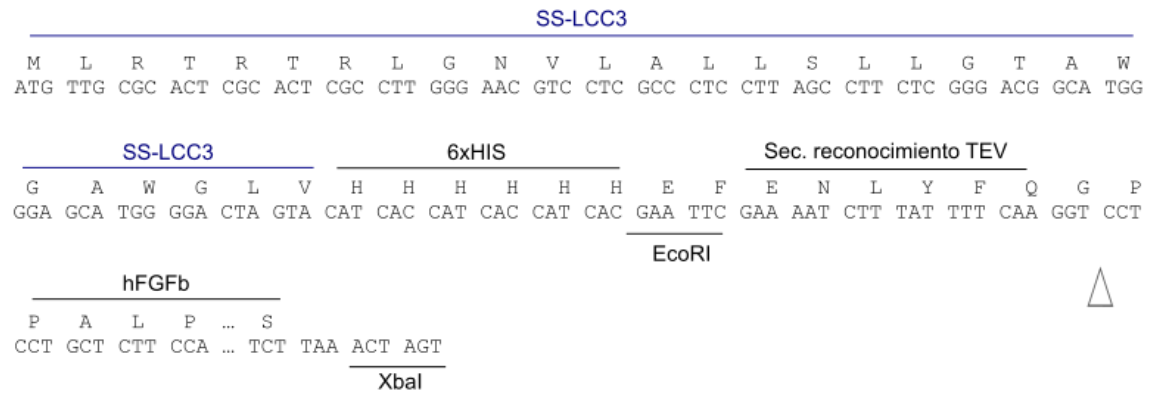


Figura 42. Análisis de producción de rhFGFb en levaduras transformadas. Se analizaron las fracciones del pellet celular (P) y sobrenadante (SN) mediante *western blot* y se reveló con anticuerpo anti-HIS. **M:** Marcador de peso molecular *Colorplus Prestained Protein Standard* (New England Biolabs)

Uno de los factores que se evalúan en la puesta a punto de la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris* es la utilización de distintas señales de secreción (Juturu y Wu, 2018). En función de los resultados de la primera prueba de expresión de rhFGFb, que mostraron una posible retención en las células de una proteína revelada específicamente con el anticuerpo anti-HIS, diseñamos una nueva construcción utilizando una secuencia señal distinta. Se reemplazó la secuencia señal del factor α de *S. cerevisiae* del plásmido pPIC_FGFb por la secuencia señal de la lacasa LCC3, previamente caracterizada en el laboratorio (Campos et al., 2016), para obtener el vector pPIC_L3FGF (Figura 43).

A



B

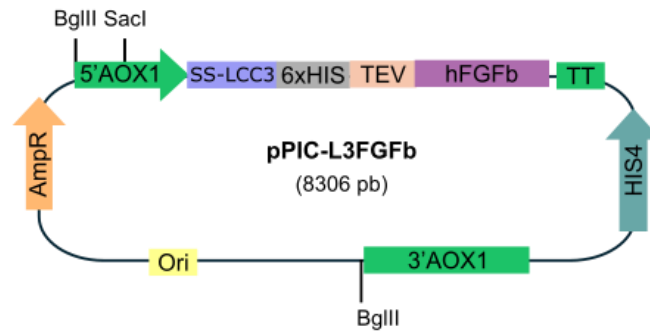


Figura 43. Esquema de la fusión SS-LCC3-TEV-FGFb y vector pPIC_L3FGFb. La flecha indica el sitio de corte de la proteasa TEV. **5'AOX1 y 3'AOX:** secuencias 5' y 3' del gen AOX, respectivamente; **TT:** terminador de la transcripción **SS-LCC3:** secuencia señal de la lacasa LCC3; **6xHIS:** etiqueta N-terminal de 6 histidinas; **His4:** gen de la histidinol deshidrogenasa de *P. pastoris* para la selección de levaduras recombinantes; **AmpR:** gen de resistencia a ampicilina para selección en *E. coli*.

El vector pPIC_L3FGF linealizado se utilizó para transformar la cepa GS115 y los clones obtenidos se verificaron por PCR con los oligonucleótidos iniciadores 5AOX_Fw y 3AOX_Rv (figura 44).

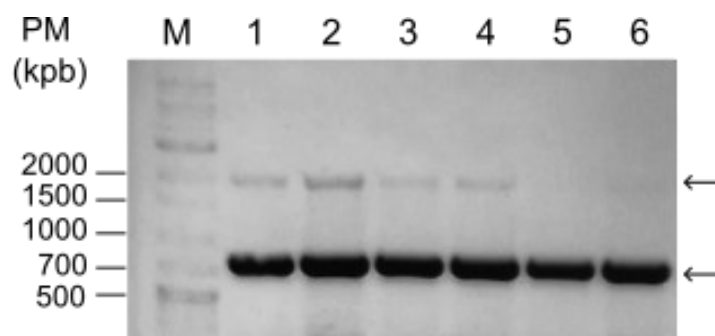


Figura 44. Verificación de la integración del transgen de L3FGFb el genoma de *P. pastoris*. Las muestras de PCR fueron analizadas en geles de agarosa 1%. Los números representan los distintos clones de *P. pastoris*; **M**: Marcador de peso molecular 1kb Plus (Dongsheng Bio). Se señalan con flechas las bandas correspondientes al producto de amplificación de la construcción de L3FGFb (776 pb) y del gen AOX1 endógeno (2200 pb).

A continuación, ensayamos distintas condiciones de cultivo que habían resultado promisorias para otras proteínas recombinantes expresadas en *P. pastoris* con las que se estaba trabajando en el laboratorio. Se evaluaron variaciones en la densidad óptica inicial, la cantidad de metanol usado para la inducción, el agregado de sorbitol como fuente de carbono adicional, el pH del medio de cultivo, la temperatura de incubación y el tiempo de producción (tabla 6). Para la expresión de rhFGFb, se incorporó un clon correspondiente a las levaduras transformadas con la construcción L3FGFb. Sin embargo, no fue posible detectar la proteína recombinante en los sobrenadantes de cultivo bajo ninguna de las condiciones evaluadas.

Proteína	D.O	Inducción (c/24hs)	Fuente de carbono adicional	T°	pH	Tiempo (días)
rhFGFb	10	Metanol 5%	-	28°C	6	4
rhFGFb	10	Metanol 0,5%	3% Sorbitol (día 2)	28°C	6	4
rhFGFb	1	Metanol 0,5%	3% Sorbitol (días 1 y 3)	28°C	6	4
rhFGFb	10	Metanol 1%	-	25°C	5,3	4
rhFGFb (L3)	10	Metanol 1%	-	25°C	5,3	4
rhBMP4	5	Metanol 0,5%	-	25°C	5,3	7
rhBMP4	5	Metanol 1%	-	25°C	5,3	7

Tabla 6. Variaciones ensayadas en el esquema producción de rhFGFb y rhBMP4 en *P. pastoris*

Discusión

1. Expresión de rhFGFb en biorreactores vegetales

El factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb) es una de las citoquinas de mayor relevancia en investigación en células madre y terapias regenerativas, en particular para el cultivo de células madre embrionarias humanas (hESC) (Levenstein et al., 2006). Las plantas como biorreactores representan un sistema interesante para la expresión de rhFGFb, ya que permitirían una producción potencialmente rentable y escalable, con mínimos riesgos de contaminación con patógenos animales (Buyel, 2019).

Durante la última década, se han explorado varios métodos de transformación para producir hFGFb recombinante en plantas. Entre los sistemas de transformación nuclear, diversos trabajos estudiaron la expresión de rhFGFb en el endosperma de semillas como estrategias para mejorar la estabilidad de la proteína y facilitar los procesos *downstream* de producción. Ding y colaboradores expresaron un rhFGFb biológicamente activo en semillas de soja, obteniendo niveles de expresión de 2,3% de la proteína soluble total (PTS) (Ding et al., 2006). En otro trabajo se logró expresar rhFGFb en el endosperma del arroz, alcanzando niveles de acumulación de hasta 185,7 mg/kg de grano (An et al., 2013). La proteína recombinante fue purificada utilizando una columna de afinidad por heparina y resultó biológicamente activa en ensayos de proliferación celular y reparación de heridas. Sin embargo, la recuperación final de rhFGFb se vio afectada por la insolubilidad de la proteína recombinante, recuperando un 4,5% de la proteína total expresada (An et al., 2013). Otra estrategia de optimización implicó fusionar rhFGFb con oleosina, lo que permitió la expresión de un rhFGFb funcional dentro de cuerpos grasos en semillas de *Arabidopsis thaliana* (Yang et al., 2018). Con este método, se alcanzaron niveles de expresión de rhFGFb de hasta 89,9 ng de rhFGFb por microlitro de cuerpos grasos. Es importante destacar que la proteína recombinante recuperada se encontraba fusionada a la oleosina y no se llevaron a cabo tratamientos adicionales para obtener un rhFGFb purificado.

Considerando las ventajas potenciales de la transformación del genoma plasmídico, nos propusimos evaluar la factibilidad de utilizar esta estrategia para expresar rhFGFb de forma estable en *Nicotiana tabacum*. Un estudio reciente demostró la factibilidad de expresar rhFGFb en plantas de tabaco transplastómicas (Wang et al., 2016). En dicho trabajo, se obtuvieron niveles de expresión de rhFGFb del 0,1% respecto a las proteínas solubles totales (PTS), resultando menor a los reportes obtenidos para la transformación nuclear. A su vez, en el trabajo de Wang y colaboradores no se realizaron estudios sobre la actividad biológica de la proteína recombinante.

En nuestro trabajo, logramos expresar y purificar rhFGFb biológicamente activo a partir de hojas de plantas transplastómicas de *N. tabacum*. Para evaluar su funcionalidad, realizamos un ensayo de proliferación utilizando células HEK293T. Los niveles de acumulación de rhFGFb alcanzados en las líneas transplastómicas UTR-FGF 3 fueron de 0,3% PST. Dado que la purificación es el paso más costoso en la producción de proteínas recombinantes, resulta crucial desarrollar procedimientos simples y rápidos para minimizar los costos de producción (Oliveira y Domingues, 2018). En este trabajo desarrollamos un protocolo basado en la utilización de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), utilizando columnas caseras de resina Ni-NTA. De esta forma, evitamos el uso de equipos de cromatografía sofisticados que podrían incrementar los costos. El protocolo de purificación desarrollado permitió purificar la proteína de interés a partir de hojas de plantas transplastómicas, dado que la proteína se encuentra fusionada a una etiqueta de histidinas N-terminal.

El rhFGFb purificado mostró una actividad biológica comparable a la del rhFGFb comercial (Gibco FGF, PHG0026), a pesar de que la purificación no fue exhaustiva. Mediante este protocolo logramos recuperar aproximadamente 4,4% del rhFGFb soluble acumulado en hojas de plantas transplastómicas. Si bien el rendimiento fue relativamente bajo, resultó comparable al obtenido por An et al. Resulta importante destacar que una proporción del rhFGFb expresado permaneció en la fracción insoluble, afectando negativamente el rendimiento de la purificación. La insolubilidad podría estar relacionada con la formación de cuerpos de inclusión, reportados en cloroplastos tanto para proteínas endógenas como para la expresión de proteínas heterólogas (Fernández-San Millán et al., 2003). Una posible optimización del protocolo de purificación podría implicar la sonicación de la muestra, modificaciones en el pH del *buffer* de extracción, el tratamiento térmico o el uso de otras etiquetas de purificación que puedan mejorar la solubilidad de la proteína recombinante (Buyel et al., 2015)(Buyel et al., 2015).

La etiqueta 6xHIS es una etiqueta proteica muy utilizada para la purificación de proteínas recombinantes en varios sistemas de expresión (Lichty et al., 2005). Se ha demostrado que su fusión con la proteína rhFGFb mejora la solubilidad de la proteína recombinante (Imsoonthornruksa et al., 2015). Además, estudios previos realizados en *E. coli* demostraron que la fusión de una etiqueta 6xHIS, tanto en la posición N-terminal o C-terminal, no tiene ningún efecto perjudicial sobre la actividad de las proteínas (Leelavathi y Reddy, 2003; Valdez-Ortiz et al., 2005) (Lee et al., 2017). Si bien las etiquetas de poli-histidinas se han utilizado para la purificación de proteínas producidas en biorreactores vegetales (Leelavathi y Reddy, 2003; Valdez-Ortiz et al., 2005), existe

una limitación en su empleo que radica en la posible interferencia con proteínas vegetales endógenas (Coates et al., 2022).

Nuestros resultados mostraron que una fracción de rhFGFb recombinante fue procesada produciéndose la eliminación de la etiqueta 6xHIS. Teniendo en cuenta este procesamiento y las limitaciones del uso de etiquetas de histidinas en plantas, consideramos que el cambio de la etiqueta *N*-terminal podría mejorar la purificación y el método de detección de la proteína recombinante. Una posible alternativa sería la utilización de la etiqueta proteica Cysta-tag, diseñada por Sainsbury y colaboradores (Sainsbury et al. 2016). Esta etiqueta permite facilitar la purificación de proteínas recombinantes producidas en plantas utilizando la técnica IMAC y podría ser una alternativa para mejorar el rendimiento de purificación de rhFGFb en plantas transplastómicas. Asimismo, para obtener un rhFGFb en condiciones adecuadas para su uso en laboratorios, se deberá adicionar al protocolo un paso de tratamiento con una enteroquinasa que reconozca la secuencia correspondiente para eliminar la etiqueta 6xHIS.

Si bien los niveles de acumulación de rhFGFb fueron suficientes tanto para su purificación como para los ensayos de actividad biológica, no resultaron comparables con los niveles de acumulación notablemente altos obtenidos para ciertas proteínas recombinantes expresadas previamente en el laboratorio (Lentz et al., 2010; Segretin et al., 2012). Hasta el momento, no ha sido posible anticipar qué proteínas recombinantes se acumularán exitosamente en plantas transplastómicas. Sin embargo, se ha demostrado que el entorno reductor del estroma del cloroplasto afecta negativamente la estabilidad de proteínas recombinantes que requieren de la formación de puentes disulfuro para su correcto plegamiento como se demuestra en el caso del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) recombinante (Wirth et al., 2006). Por otro lado, un estudio previo demostró que el redireccionamiento de la proteína hEGF al lumen del tilacoides resulta en una mayor acumulación de la proteína recombinante (Morgenfeld et al., 2020). La presencia de puentes disulfuro en hFGFb (Müller et al., 2015) podría explicar, al menos parcialmente, los bajos niveles de acumulación alcanzados. Sería interesante evaluar el redireccionamiento de la proteína recombinante al lumen de tilacoides y verificar si esta es una estrategia efectiva para aumentar los niveles de acumulación de hFGFb.

Asimismo, los bajos niveles de rhFGFb obtenidos podrían estar relacionados con un efecto tóxico de rhFGFb en la fisiología del cloroplasto. Esta hipótesis estaría sustentada en la observación de fenotipos anormales en las líneas UTR-FGF, que

incluyeron una marcada clorosis y retraso en el crecimiento. Existen reportes en bibliografía que relacionan fenotipos anormales de plantas transplastómicas con heteroplastia o rearrreglos genéticos (Ahlert et al., 2003; Rogalski et al., 2008). Sin embargo, el análisis de *Southern blot* y el ensayo de segregación del transgen sugieren que las líneas han alcanzado el estado de homoplastia. Asimismo, según lo observado en el *Southern blot*, no hay evidencias de posibles rearrreglos genéticos. En conjunto, estas observaciones sugieren que la proteína recombinante hFGFb puede tener un efecto tóxico en la fisiología del cloroplasto con un posible impacto negativo en la fotosíntesis.

El análisis de la eficiencia fotosintética de las líneas UTR-FGF mediante la técnica de PAM (*pulse amplitud modulation*) demostró que estas plantas presentan un severo impedimento en su capacidad para realizar reacciones fotoquímicas, como lo demuestran la reducción en el rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m) y en la eficiencia del PSII (ϕ PSII). Por otro lado, el aumento del ϕ NPQ indica que estas plantas poseen mayores tasas de disipación de energía por calor, consistentes con posibles alteraciones en el ensamblado del PSII. Al analizar el fenotipo de clorosis en distintas condiciones lumínicas, observamos que la disminución de la intensidad lumínica no revierte el fenotipo clorótico en las líneas transplastómicas UTR-FGF.

Estudios previos del laboratorio mostraron una reversión del fenotipo de clorosis en plantas transplastómicas que expresan la proteína VHH en el lumen del tilacoides (Lentz et al., 2012). A su vez, en dicho estudio corroboraron que la acumulación de la proteína recombinante era mayor en plantas crecidas en sombra. El fenotipo observado podría entonces relacionarse con un efecto tóxico de la proteína recombinante. A mayores intensidades lumínicas aumenta el metabolismo plastídico y la tasa de transcripción (Staub y Maliga, 1993), lo cual podría llevar a una acumulación de la proteína VHH en el estroma por saturación de los mecanismos de traslocación al tilacoide.

Al analizar el fenotipo de clorosis en distintas condiciones lumínicas para las líneas UTR-FGF no observamos reversión del fenotipo. Esto indicaría que el efecto tóxico de la proteína recombinante rhFGFb no estaría influenciado por las condiciones lumínicas. Si existiera un fenómeno de fotoinhibición en las líneas UTR-FGF crecidas en condiciones de luz normales, esperaríamos que el mismo se vea reducido al bajar la intensidad de luz resultando en un fenotipo menos marcado. Dado que el fenotipo clorótico de las líneas UTR-FGF no fue revertido en condiciones de baja luz, inferimos

que el detrimento en la fotosíntesis observado en las plantas UTR-FGF crecidas en condiciones normales de luz no estaría asociado a efectos fotoinhibitorios.

En el estudio realizado por Ahmad et al, se observó reversión del fenotipo de clorosis y retraso del crecimiento cuando las plantas transplastómicas que expresaban Cr-PTOX (*plastid terminal oxidase 1*) eran sometidas a menores intensidades de luz (Ahmad et al., 2012b). El análisis de desempeño fotosintético en estas plantas mostraba una disminución en la eficiencia fotosintética máxima (F_v/F_m) en comparación con las plantas silvestres. Estas observaciones sugirieron que la luz causaba un daño en el PSII, asociado a un efecto fotoinhibitorio. Si bien las líneas UTR-FGF presentaron una disminución en su eficiencia fotosintética, el hecho de que su fenotipo clorótico no se viera revertido al disminuir la luz indicaría que los efectos pleiotrópicos en estas líneas no estarían asociados a fotoinhibición. Esto sugiere una posible interferencia de rhFGFb en el desarrollo de los cloroplastos.

Existe evidencia de que hFGFb se une a moléculas de fosfatidil-inositol-bisfosfato (PIP₂) ubicadas en la membrana plasmática de las células animales (La Venuta et al., 2016). La membrana tilacoide está formada principalmente por los galactolípidos monogalactosil-diacil-glicerol (MGDG) y digalactosil-diacil-glicerol (DGDG). A su vez, un 10% de esta membrana corresponde a poseer un único fosfolípido de carga negativa, el fosfatidil-glicerol (PG) (Messant et al., 2021). Este fosfolípido se distribuye de forma uniforme entre las granas y las lamelas de la membrana tilacoide (Duchêne y Siegenthaler, 2000). Teniendo en cuenta la homología estructural entre el PIP₂ y PG (composición lipídica y carga), hipotetizamos que rhFGFb podría unirse a PG en la membrana tilacoide y causar un impacto en el ensamblado de los LHCs. El análisis de mutantes deficientes en lípidos reveló un papel importante de la PG en la fotosíntesis y la biogénesis de la membrana tilacoide (Kobayashi, 2016), respaldando nuestra hipótesis. Para analizar la integridad de la membrana tilacoides e investigar potenciales efectos de rhFGFb a nivel del desarrollo plastídico se planea realizar ensayos de microscopía electrónica en las líneas UTR-FGF.

Por otro lado, se estudió la expresión de hFGFb en una plataforma de expresión transitoria basada en agroinfiltración en *N. benthamiana*, sistema muy atractivo para la producción de proteínas recombinantes. Los tiempos cortos asociados a este sistema permiten realizar una evaluación rápida de la expresión de distintas proteínas recombinantes, facilitando distintos estudios sobre la expresión, estabilidad y acumulación de una dada proteína recombinante (Beritz et al., 2024). En particular representa una manera rápida de direccionar la proteína de interés a diferentes destinos

subcelulares para estudiar su acumulación. La elección del compartimento subcelular puede afectar la estabilidad, los niveles de acumulación y la posterior purificación de una proteína (Tschofen et al., 2016), y dependerá de las características estructurales y bioquímicas de cada proteína recombinante que se desee producir.

En nuestro trabajo generamos un sistema de clonado modular basado en el método de *Golden Gate Assembly* para el clonado de proteínas recombinantes fusionadas a distintas señales de localización subcelular (Engler y Marillonnet, 2013). El sistema permite direccionar proteínas recombinantes a los siguientes compartimentos subcelulares: citoplasma, apoplasto, retículo endoplasmático y vacuola. Este sistema nos permitió analizar la acumulación del rhFGFb en distintos compartimentos subcelulares para así determinar la localización subcelular ideal para esta proteína recombinante.

Si bien el direccionamiento al apoplasto facilita la purificación de la proteína recombinante, se debe tener en cuenta que la existencia de proteasas en el medio extracelular puede afectar la estabilidad de la proteína recombinante (Benchabane et al., 2008). Una posible estrategia para evitar la proteólisis es la retención de la proteína en el retículo endoplasmático a través de la adición de una señal H/KDEL. Esto es posible para las proteínas que no requieran de modificaciones posteriores propias del pasaje a través del trans-golgi. Estudios previos mostraron que la retención en retículo de un anticuerpo monoclonal contribuye a aumentar su estabilidad cuando se expresa en semillas (Petruccelli et al., 2006). Por otro lado, se demostró que la acumulación de ciertas proteínas recombinantes aumenta al ser direccionadas a la vacuola central, en comparación con el citoplasma y el apoplasto (Ocampo et al., 2016).

Nuestros resultados preliminares demostraron que los compartimentos que permiten alcanzar mayores niveles de acumulación de rhFGFb son el retículo endoplasmático y la vacuola. El entorno del retículo endoplasmático podría contribuir a la estabilidad de la proteína recombinante gracias a que favorece la formación de puentes disulfuro. Sin embargo, debido a que los niveles de expresión de rhFGFb fueron más bajos de los esperados para este sistema, no fue posible determinar de forma fehaciente cuál compartimento subcelular es el óptimo.

Al comparar este sistema con la transformación del genoma plasmídico, observamos que la acumulación de rhFGFb resultó menor (comparada por peso fresco) respecto a las plantas transplasmídicas. Entre las posibles causas que expliquen los bajos niveles de acumulación de rhFGFb observados durante la expresión transitoria en

N. benthamiana, proponemos la presencia de sitios de poliadenilación alternativos, identificados durante un análisis *in silico* realizado en el marco de esta Tesis. La presencia de estas señales podría estar interfiriendo en el correcto procesamiento del mRNA *in vivo*. Si bien esta hipótesis aún no ha sido contrastada experimentalmente, consideramos que la utilización de una secuencia optimizada únicamente para la expresión en *N. benthamiana* podría resultar en un aumento de los niveles de expresión de rhFGFb.

2. Expresión de factores de crecimiento recombinantes en *Pichia pastoris*

La optimización de la producción de proteínas recombinantes humanas no es trivial, y el sistema de expresión en *P. pastoris* no es la excepción. Diversos factores pueden influir y ser cruciales en el rendimiento de la expresión; desde el diseño de las construcciones genéticas para lograr inserciones múltiples, la elección del promotor y secuencias de secreción y la optimización del uso de codones, hasta las cepas usadas y los esquemas de inducción, fuentes de carbono y condiciones de cultivo, tanto en escala de laboratorio como en biorreactores (Juturu y Wu, 2018). Aun así, los niveles de expresión pueden ser muy bajos e incompatibles con su producción comercial. En este trabajo, se propuso ensayar la expresión de hFGFb y hBMP4 en *P. pastoris* a fin de contar rápidamente con una fuente de factores de crecimiento recombinantes para suplir a los laboratorios de investigación locales, a la vez que se desarrollaba su producción en los biorreactores vegetales.

La levadura *P. pastoris* ha sido utilizada para la producción de proteínas recombinantes humanas, incluyendo interleuquinas, hormonas, interferón y factores de crecimiento, entre otras (Karbalaei et al., 2020). Tanto hFGFb como hBMP4 fueron expresados previamente en *P. pastoris* con rendimientos de 150 mg rhFGFb/L cultivo (Mu et al., 2008) y 48 mg rhBMP4/L cultivo (Huang et al., 2014). A diferencia de lo realizado en esta Tesis, en estos trabajos los autores seleccionaron los mejores clones productores a partir de un mayor número de transformantes (por ej. Huang y col analizan 96 clones) y determinaron la expresión de las proteínas recombinantes utilizando la técnica de ELISA, que tiene una sensibilidad muy superior a la detección con anti-HIS por *western blot*. Esta pre-selección de los mejores clones, permitió en ambos trabajos la optimización de los parámetros de producción (pH del medio, tiempo de cultivo, concentración de metanol, temperatura de cultivo) y la purificación y concentración de las proteínas recombinantes a partir de una mayor escala que en esta Tesis. Por

ejemplo, el máximo valor alcanzado para rhFGF (150mg/L, Mu y col., 2008) se logró en una muestra purificada y concentrada obtenida a partir de 2 L de cultivo.

Por último, un factor a considerar es la sub-optimización en el uso de codones de las secuencias codificantes utilizadas en esta Tesis. Para hFGFb se realizó una optimización híbrida entre el uso de codones en *P. pastoris* y en cloroplastos de tabaco, mientras que para hBMP4, si bien la optimización fue realizada sólo para *P. pastoris*, ésta difiere de la realizada por Huang y colaboradores para la misma proteína. Estos factores, además de otros posibles como el procesado incorrecto de la secuencia señal o la proteólisis de la etiqueta de histidinas, podrían ser determinantes de una baja expresión y/o detección de las proteínas recombinantes. Aunque el ensayo de nuevas estrategias para la expresión de rhFGFb y rhBMP4 en *P. pastoris* supera los objetivos iniciales de esta Tesis de obtener una fuente rápida y económica de estos factores de crecimiento, los resultados obtenidos constituyen un importante antecedente para futuros trabajos del laboratorio en la mejora y optimización del sistema.

Conclusión general

En el presente trabajo evaluamos tres sistemas alternativos para la producción de rhFGFb. Contrario a lo esperado, el sistema de *P. pastoris* no resultó eficiente para la expresión de esta proteína recombinante. En el caso de los biorreactores vegetales, pudimos producir rhFGFb tanto mediante expresión transitoria en *N. benthamiana* como por transformación del genoma plastídico en *N. tabacum*.

De los sistemas estudiados, la expresión en plantas transplastómicas resultó ser el más prometedor para producir rhFGFb biológicamente activo y en condiciones adecuadas para su utilización en cultivos de células madre. A pesar de los fenotipos observados, las plantas transplastómicas expresaron un rhFGFb que pudo ser purificado, obteniéndose cantidades adecuadas y con calidad suficiente para proceder a los ensayos de actividad biológica. Durante este trabajo también detectamos instancias que podrán ser optimizadas para mejorar la producción de rhFGFb en plantas transplastómicas. A su vez, las líneas UTR-FGF servirán como herramienta para el estudio de los mecanismos subyacentes a los efectos pleiotrópicos que se encuentran ocasionalmente asociados a la transformación del genoma plastídico.

Materiales y Métodos

1. Cepas bacterianas

1.1. *Escherichia coli*

1.1.1. Condiciones de cultivo

Se utilizaron las cepas DH10B o ccdB Survival™ (Invitrogen) de *E. coli*. Para los cultivos líquidos se utilizó el medio de cultivo LB (peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L) y se incubó a 37°C con agitación (220 r.p.m). Los cultivos sólidos se crecieron en medio LB-Agar (1,5%) en placas de petri y se incubaron a 37°C. El medio se suplementó con antibióticos según la resistencia otorgada por cada plásmido y en las siguientes concentraciones: ampicilina 100 mg/L, kanamicina 50 mg/L.

1.1.2. Preparación de células electro-competentes de *E. coli*

Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* en 10 mL de medio LB líquido y se incubó a 37°C con agitación durante toda la noche. A continuación, se diluyó el cultivo en 1 L de medio LB fresco en una relación 1:100, y se incubó en agitación a 37°C hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0,6. Los cultivos se mantuvieron en hielo durante 15 minutos y luego se centrifugaron 15 minutos a 4.000 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el precipitado con agitación suave, en 1L de agua fría estéril. A continuación, se centrifugó 15 minutos a 4.000 g (4°C) y el precipitado se resuspendió suavemente en 500 mL de agua fría estéril. Tras una nueva centrifugación durante 15 min a 4.000 g (4°C), el precipitado se resuspendió en 20 mL de glicerol 10% frío. Finalmente, luego de otra centrifugación durante 15 minutos a 4.000 g (4°C), se resuspendió el precipitado en 2-3 mL de glicerol 10% frío estéril y se dispensó en tubos *ependorf* que se conservaron a -70°C hasta su utilización.

1.1.3. Transformación de células electrocompetentes de *E. coli*

Se mezclaron 50 µL de bacterias electrocompetentes con 0,5-1 µL de ADN plasmídico en cubetas de electroporación de 2 mm de espesor (Molecular Bioproducts) previamente enfriadas. Se le dio un pulso de 2,5kV utilizando el programa Ec2 del equipo electroporador “Micropulser” (BioRad), y se agregó 1 mL de medio LB líquido. La suspensión bacteriana se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación y luego se sembraron 125 µL del cultivo bacteriano en placas con LB-Agar adicionada con el antibiótico correspondiente.

1.2. *Agrobacterium tumefaciens*

1.2.1. Condiciones de cultivo.

Se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* GV3101, la cual posee resistencia a gentamicina otorgada por el plásmido pTiC58 y resistencia genómica a rifampicina. Los cultivos líquidos se incubaron en medio LB a 28°C en agitación (200 r.p.m) y los cultivos sólidos en medio LB-Agar a 28°C. Los medios se suplementaron con los antibióticos rifampicina, gentamicina y el correspondiente según el vector de transformación utilizado.

1.2.2. Preparación de células electrocompetentes de *A. tumefaciens*

Una colonia aislada de *A. tumefaciens* se inoculó en 5 mL de medio LB suplementado con rifampicina (0,1 mg/mL) y gentamicina (0,05 mg/mL). Se inocularon varias alícuotas separadas para llegar a un volumen final de 30-50 mL de cultivo. Los cultivos se crecieron durante toda la noche a 28°C. A continuación, se juntaron los cultivos en dos tubos *falcon* estériles. Los cultivos se centrifugaron durante 15 min a 4000 *g* (4°C) y se descartó el sobrenadante. Los precipitados de cada alícuota se resuspendieron suavemente en 20 mL de agua estéril fría. Se volvió a centrifugar bajo similares condiciones y los precipitados se resuspendieron en 10 mL de agua estéril fría. Se juntaron ambas suspensiones y se realizó otra centrifugación bajo las mismas condiciones. El precipitado se resuspendió en 2 mL de glicerol 10 % estéril frío. A continuación, se realizó una última centrifugación con idénticas características a las anteriores y el precipitado final se resuspendió en 1 mL de glicerol 10% frío. Las bacterias así preparadas se separaron en alícuotas y se conservaron a -70°C.

1.2.3. Transformación de células competentes de *A. tumefaciens*.

Las bacterias electrocompetentes de *A. tumefaciens* se por electroporación. Se mezclaron 50µl de bacterias electrocompetentes con 0,5-1 µL de ADN plasmídico en cubetas de electroporación de 2mm de espesor (Molecular Bioproducts) previamente enfriadas. Se le dio un pulso de 2,2kV utilizando el programa Agr del equipo electroporador “Micropulser” (Biorad), y se agregó 1 mL de medio LB líquido. La suspensión bacteriana se incubó 90 minutos a 28°C en agitación (220 r.p.m) y luego se sembraron 125 µL del cultivo bacteriano en placas con LB-Agar adicionada con rifampicina (0,1mg/mL), gentamicina (0,05mg/mL) y el antibiótico correspondiente según el plásmido utilizado en la transformación.

2. Líneas de plantas

Se utilizaron plantas de *N. tabacum* del cultivar Petit Havana para la transformación de cloroplastos por biobalística. Para los ensayos de expresión transitoria se utilizaron plantas de *N. benthamiana*. Las plantas se crecieron en invernadero cerrado con un fotoperíodo controlado de 14/10 horas de luz/oscuridad y a una temperatura de 25-30°C.

3. Plásmidos

- pZero-2 (Invitrogen Life Technologies): Vector de clonado para productos de amplificación por PCR.
- pPICNHIS: Vector de expresión en *P. pastoris* derivado del vector comercial pPIC9 (Invitrogen Life Technologies), al que se le agregó una secuencia codificante de un tracto de 6 histidinas río abajo de la secuencia de la señal secreción del factor α de *S. cereviceae*.
- PIC9KNHIS: Vector de expresión en *P. pastoris* derivado del vector comercial pPIC9 9K (Invitrogen Life Technologies), al que se le agregó una secuencia codificante de un tracto de 6 histidinas río abajo de la secuencia de la señal secreción del factor α de *S. cereviceae*. Este vector contiene un gen de resistencia a kanamicina para la selección de clones con múltiples copias del cassette de expresión.
- pUTR: Vector de transformación de cloroplastos desarrollado previamente en el laboratorio (Segretin et al., 2012; Wirth et al., 2006). El vector contiene dos secuencias de homología con el genoma pastídico que permiten la integración de los transgenes por recombinación homóloga. Además, posee un gen de resistencia a espectinomicina. Como elementos regulatorios de la transcripción posee promotores Prnn y terminadores de la transcripción correspondientes al gen *rps16*. A su vez, río arriba del gen de interés posee una secuencia regulatoria 5'UTR obtenida del gen *PsbA*.
- pUTR-FGFb: Vector de transformación de cloroplastos que contiene la secuencia codificante sintética del transgen 6xHIS-TEV-FGFb.
- pUTR-CCDB: Vector de transformación de cloroplastos pUTR conteniendo una versión truncada del gen que codifica para la toxina ccdB flanqueada por sitios de restricción BsaI. Esta secuencia fue clonada en nuestro laboratorio por el Dr. Federico G. Mirkin.

- pEAQ-HT-GFP: Vector binario optimizado para la expresión transitoria de proteínas en *N. benthamiana*, desarrollado por Sainsbury (Sainsbury et al., 2009). El vector contiene el gen de GFP y el gen de supresión de silenciamiento viral P19, ambos regulados por un promotor transcripcional 35S (derivado del virus del mosaico del coliflor). Estas secuencias se encuentran flanqueadas por el borde derecho e izquierdo del T-DNA. Como agente selector contiene un gen que confiere resistencia a kanamicina (*NPTII*).
- pEAQ-Golden: Vector adaptado a partir del pEAQ-HT-GFP a través de la adición de sitios de reconocimiento de la enzima BsaI que permiten el clonado por Golden Gate Assembly. Este vector a su vez posee mutaciones sinónimas en el gen P19 para eliminar sitios preexistentes de la enzima BsaI.
- pBIN-P19
- pHap12: Vector derivado del plásmido pUC18, conteniendo la secuencia que codifica el precursor de la proteína osmotina AP24 de tabaco. Este vector fue amablemente cedido a nuestro laboratorio por el Dr. Lázaro Hernández (CIGB, Cuba).
- pUCGFPIInkEGF: Vector pUC18 conteniendo la secuencia de la proteína GFP fusionada a la proteína EGF. La secuencia nucleotídica de GFP no contiene sitios de BsaI.

4. Secuencias

4.1 Proteínas expresadas

- **rhFGFb**: Secuencia nucleotídica y aminoacídica del transgen rhFGFb obtenido mediante síntesis. Se muestran: los sitios de restricción de las enzimas NdeI, EcoRI y XbaI (gris), la secuencia de 6xHIS N-terminal (subrayado), sitio de reconocimiento de la peptidasa de la señal TEV (negrita) y la secuencia codificante de rhFGFb (amarillo).

CATATGCATCATCATCATCATCATGAATTCGAAAATCTTTATTTTCAAGGTCCTGCTCTTCAG
AAGATGGAGGTTCTGGTGCTTTCCCTCCTGGACATTTCAAGGATCCTAAGAGACTTTATTGCAA
GAATGGAGGTTCTTTTTGAGAATCCATCCTGATGGTAGGGTTGATGGAGTTAGAGAAAAATCT
GATCCTCATATTAAGCTTCAGCTTCAGGCTGAGGAGAGGGGTGTTGTTTCAATTAAGGGTGTTT
GTGCAAACAGATATCTTGCTATGAAGGAAGATGGTAGGCTTTTGGCATCTAAGTGTGTTACTGA
TGAATGTTTTTTCTTTGAAAGGCTTGAGTCTAACAATTATAACACTTATAGATCAAGAAAGTAT

ACTTCATGGTATGTTGCACTTAAAAGAACTGGACAGTATAAGCTTGGTTCTAAGACTGGTCCTG
GACAGAAAGCTATTCTTTTCTTCCAATGTCTGCAAAGTC**TTAATCTAGA**

MHHHHHHEFENLYFQ**GPALPEDGGSGAFPPGHFKDPKRLYCKNGGFFLR**HPDGRVDGVREKSD
PHIKLQLQAEERGVS**SIKGV**CANRYLAMKEDGRLLASKCVTDECFFFERLESNNYNTYRSRKYT
SWYVALKRTGQYKLGSKTGPGQKAILFLPMSAKS

- **rhBMP4:** Secuencia nucleotídica y aminoacídica del transgen rhBMP4 obtenido mediante síntesis. Se muestran: los sitios de restricción de las enzimas EcoRI y SpeI (gris), el sitio de reconocimiento de la peptidasa de la señal TEV (negrita) y la secuencia codificante de hrBMP4 (amarillo).

GAATTCGAAAAC**TTGTACTTTCAA**TCTCCAAAGCATCACTCTCAAAGAGCTAGAAAGAAAAACA
AAAAC**TGTAGAAGACATTCTTTGTATGTTGATTTCTCTGATGTTGGTTGGAATGATTGGATTGT**
TGCTCCACCTGGTTACCAAGCTTTTTATTGTCACGGAGATTGTCCATCCCTTTGGCTGATCAT
TTGAACTCTACTAATCACGCTATCGTTCAAAC**TTTGGTTAACTCTGTTAATTCTTCTATTCCAA**
AGGCTTGTTGTGTTCTACTGAATTGTCTGCTATTTCTATGTTGTACTTGGATGAGTACGATAA
GGTTGTTTTGAAAAACTACCAAGAAATGGTTGTTGAGGGTTGTGGTTGTAGATAA**ACTAGT**

MEFENLYFQ**SPKHHSQRARKKNKNCRRHSLYVDFSDVGW**NDWIVAPPGYQAFYCHGDCPFPLAD
HLN**STNHAIVQTLVNSVNSSIPKACCVPTELSAISMLYLDEYDKVVLKNYQEMVVEGCG**
CR

- **GFP:** Secuencia de nucleotídica y aminoacídica de la proteína fluorescente GFP obtenida por amplificación por PCR a partir del vector pUCGFPInkEGF. Esta secuencia de GFP no posee sitios internos de reconocimiento de BsaI. Se amplificó utilizando los primers que poseen los sitios de restricción BsaI para el clonado por Golden Gate Assembly. Se muestran los sitios de reconocimiento de la enzima BsaI (gris) y la secuencia codificante GFP (amarillo).

ATTGGTCTCTTGCT**ATG**ACTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGT
TGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCA
ACATACGGAAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCATGGCCAA
CACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACG
GCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAG
GATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAA
TCGAGTTAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAA
CTATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTC
AAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTC
CAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTC

GAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATT
ACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAA TCTATGAGACCTT

MTSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTT
FSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKG
IDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDG
PVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYK

- **mKOk:** Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la proteína fluorescente naranja mKO obtenida por amplificación por PCR utilizando primers que incorporan los sitios de reconocimiento de la enzima BsaI (gris). En amarillo se muestra la secuencia codificante de la proteína.

AAAGGTCTCTTGCTATGGTTTCCGTGATAAAACCGGAGATGAAGATGCGATATTACATGGATGGA
AGCGTTAATGGACATGAATTTACAATTGAAGGAGAGGGTACTGGTCGTCCCTATGAAGGCCACC
AGGAGATGACATTGCGAGTTACTATGGCAGAGGGTGGGCCTATGCCTTTTGCATTTCGACCTTGT
CTCCCATGTGTTCTGTTATGGACACAGGGTTTTACAAAATATCCTGAGGAGATCCCGGATTAT
TTCAAGCAGGCATTCCTCGAAGGCCTGAGTTGGGAGAGATCATTAGAGTTTGAGGACGGGGGAT
CAGCCTCAGTGTCTGCTCATATTAGTTTACGTGGGAACACTTTTTACCACAAGAGTAAATTCAC
AGGCGTCAACTTCCCTGCAGACGGCCCGATTATGCAGAATCAGTCTGTTGACTGGGAACCTCA
ACGGAAAAAATCACTGCATCTGACGGTGTGCTGAAGGGGGATGTCACCATGTATTTAAAGCTGG
AGGGCGGAGGCAACCATAAATGTCAGTTTAAGACAACCTTACAAGGCCGCTAAAGAGATACTGGA
GATGCCCGGAGATCATTATATCGGACATCGATTGGTGAGAAAAACCGAGGGTAATATTACAGAG
CAAGTCGAAGACGCAGTTGCCCATTTCTTAA TCTATGAGACCTT

MVSVIKPEMKMRYMDGSVNGHEFTIEEGGTGRPYEGHQEMTLRVTMAEGGPMPPFAFDLVSHVF
CYGHRVFTKYPEEIPDYFKQAFPEGLSWERSLEFEDGGSASVSAHISLRGNTFYHKSFTGVNF
PADGPIMQNQSVDWEPSTEKITASDGV LKGDVTMYLKLEGGGNHKCQFKTTYKAAKEILEMPGD
HYIGHRLVRKTEGNITEQVEDAVAH

4.2. Señales de direccionamiento subcelular

- **Péptido señal:** Secuencia nucleotídica del péptido señal de la proteína osmotina AP24. La secuencia se obtuvo por amplificación por PCR con primers específicos que introducen los sitios BsaI (gris). La secuencia codificante del péptido señal se muestra en amarillo.

AAAGGTCTCATATGGGCAACTTGAGATCTTCTTTTGTCTTCTTCCTCCTTGCCTTGGTGACTTA
TACTTATGCTAGAGACCAAC

- **Señal vacuolar:** Secuencia nucleotídica de la señal vacuolar C-terminal del gen de la Quitinasa A de tabaco, obtenida por overlapping PCR con primers específicos que introducen los sitios BsaI (gris). En amarillo se marca la secuencia codificante de la señal vacuolar.

AAAGGTCTCA~~GGACTTTTAGTCGATACTATGTAATCTA~~TGAGACC~~TTT~~

5.3 Secuencias para la adaptación del vector pEAQ-Golden

- **Polilinker cddb-gg:** Secuencia que posee los sitios de reconocimiento BsaI que permite el clonado de secuencias por Golden Gate Assembly. La secuencia se amplificó por PCR introduciendo los sitios para el clonado NdeI y XbaI (gris). Los sitios BsaI se marcan en verde.

AAACATATGT~~GAGACC~~GTCGACCTGTGTATAAGGGAGCCTGACATTTATATTCCCCAGAACATC
AGGTTAATGGCGTTTTTGGATGTCATTTTCGCGGTGGCTGAGATCAGCCACTTCTTCCCCGATAA
CGGATACCGGCACACTGGCCATATCGGTGGTCATCATGCGCCAGCTTTCATCCCCGATATGCAC
CACCGGGTAAAGTTCACGGGAGACTTTATCTGACAGCAGACGTGCACTGGCCAGGGGGATCACC
ATCCGTCGCCCAGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAACAGACGATAACGGCTCT
CTCTTTTATAGGTGTAAACCTTAACTGCATTTACACAGTCCCTGTTCTCGTCAGCAAAAGTTT
AGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCA
TTATGGTGAAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCC
AGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCAC
AGGTATTTATTTCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGCCAACTTAGTCGAGAATTG~~GTCTCAT~~
CTAGATT

- **Secuencia P19*:** Secuencia obtenida por síntesis correspondiente a un fragmento del gen de supresión del silenciamiento P19 con mutaciones sinónimas en los sitios de reconocimiento de BsaI. En minúscula y negrita se muestran los aminoácidos que han sido mutados.

AAGCTTCACTGCACAGAGTCCTTGGATCTTGGACGGGAGATTTCGGTAACTATGCAGCATCTCG
ATTTTTTCGGTTTCGACCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACC
GTTTCTGGAGG**a**TCTCGAACTCTTCAATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAAC
TGCTACAGCTTGCCCCAATCGAAGTGGAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTGA
aACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGGGGAGCTC

5. Oligonucleótidos iniciadores

Oligonucleótido o iniciador	Secuencia 5'--3'	Uso
FGFb Fw	TTTCAAGGTCCTGCTCTTCC	Secuenciación y chequeo de clonados FGFb
FGFb Rv	AGACTTTGCAGACATTGGAAG	Secuenciación y chequeo de clonados FGFb
5'AOX1_Fw	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	Chequeo de integración de plásmido en <i>P. Pastoris</i>
3'AOX1_Rv	GCAAATGGCATTCTGACATCC	Chequeo de integración de plásmido en <i>P. Pastoris</i>
Cloro Fw	GTATCTGGGGAATAAGCATCGG	Chequeo transplastómicas UTR-FGF
Cloro Rv	CGATGACGCCAACTACCTCTG	Chequeo transplastómicas UTR-FGF
aadA nb Fw	TTAAACATCATGGGGGAAGCG	Síntesis sonda aadA
aadA nb Rv	GCGAGTTCCATAGCGTTAAGGT	Síntesis sonda aadA
CCDB5 NDE GG	AAACATATGTGAGACCGTCGACCTGTG	Clonado <i>polylinker</i> ccdb-gg
CCDB3 XBA GG	AATCTAGATGAGACCAATTCTCGACTAAG	Clonado <i>polylinker</i> ccdb-gg
AP24SS Fw	AAAGGTCTCATATGGGCAACTTGAGAT	Clonado péptido señal AP24 en vector pEAQ-Golden
AP24SS Rv	GTTGGTCTCTAGCATAAGTATAAGTCACC	Clonado péptido señal AP24
FGF GG Fw	TATGGTCTCTTGCTCATCATCATCATCATCA TGAA	Clonado FGF para fusión 5' a péptido señal AP24.
FGF GG Rv	GAAGGTCTCATAGATTAAGACTTTGCAGACA TTG	Clonado FGF en vector pEAQ-Golden
FGF RE Rv	CTTGGTCTCTAGACTTTGCAGACATTG	Clonado FGF reticular en vector pEAQ-Golden
VS 48 Fw	AAAGGTCTCAGGACTTTTAGTCGATACT	Síntesis de señal vacuolar
VS 48 Rv	AAAGGTCTCATAGATTACATAGTATCGACTA AAAGTCC	Síntesis de señal vacuolar
GFPCit Fw	ATGGTCTCTTATGACTAGCAAAGGAGAAGAA CT	Clonado GFP citoplasmático en vector pEAQ-Golden
GFP GG Fw	ATTGGTCTCTTGCTACTAGCAAAGGAGAAG	Clonado GFP para fusión 5' a péptido señal AP24.
GFP GG Rv	AGAGGTCTCATAGATTATTTGTATAGTTCAT CCATG	Clonado GFP en vector pEAQ-Golden

GFP RE Rv	TTAGGTCTCATAGATTAGAGTTCGTCCTTTT TGTATAGTT	Clonado GFP reticular en vector pEAQ-Golden
GFP VAC Rv	AAAGGTCTCATTTGTATAGTTCATCCATGCC	Clonado GFP vacuolar en vector pEAQ-Golden
VS GFP Fw	AAAGGTCTCACAAAGGACTTTTAGTCGATAC TATGTAA	Síntesis señal vacuolar para fusión con GFP
GFP Sec Fw	GAGAAGAAGCTTTTCACTGG	Secuenciación vectores con GFP
GFP Sec Rv	TTCATCCATGCCATGTG	Secuenciación vectores con GFP
mkOk Fw	AAGGTCTCTTGCTGTTTCCGTGATAA	Clonado mkOk en en vector pEAQ-Golden
mKOK AP Rv2	AAGGTCTCATAGATTAAGAATGGGCAAC	Clonado mkOk en en vector pEAQ-Golden

Tabla 7. Secuencias de los oligonucleótidos iniciadores utilizados en este trabajo.

6. Metodología del ADN recombinante

6.1. Purificación de ADN plasmídico

6.1.1. Método de lisis alcalina

Se inoculó una colonia bacteriana en 5 mL de medio LB suplementado con antibiótico (según plásmido) y se cultivó toda la noche a 37°C con agitación (220 r.p.m). Se centrifugó a 4000 *g* durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió usando una pipeta en 300 μ L de *solución 1* fría (Tris-HCl 25 mM pH=8.0, EDTA 10 mM pH=8.0, glucosa 50 mM). Para la lisis celular, se agregaron 300 μ L de *solución 2* (NaOH 200 mM, SDS 1 %), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 3-5 minutos. A continuación, se agregaron 300 μ L de *solución 3* fría (acetato de potasio 3 M, pH=5,5), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 10 minutos. Luego se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 13000 *g* (4°C). Se transfirió la fase superior a un nuevo tubo, al cual se le agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol. Se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó nuevamente a 13000 *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 μ L de etanol 70%. Se centrifugó durante 5 minutos a 13000 *g* y se secó el precipitado dejando los tubos abiertos a 37°C durante 15-30 minutos. El precipitado se resuspendió en 30 μ L de H₂O_{dd}. Por último, se agregó RNAsa (100 μ g/mL) y se incubó a 37°C durante 30 min. La integridad del ADN plasmídico se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa.

6.1.2. Purificación mediante columnas comerciales

El ADN plasmídico para ser utilizado en secuenciación se preparó mediante el sistema de purificación comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). El sistema consta de una modificación del protocolo de lisis alcalina en cuál el aislamiento del ADN plasmídico se realiza por el pasaje a través de una columna de sílica. Se siguió el protocolo especificado por el fabricante y se eluyó el ADN utilizando 50-100 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$. La integridad del ADN plasmídico se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa.

6.2. Preparación de plásmidos e insertos para el clonado molecular

6.2.1. Amplificación de insertos por PCR

La amplificación de fragmentos de ADN para su clonado molecular se realizó utilizando PCR con la enzima Pfu ADN polimerasa (GDSBio) o Phusion ADN polimerasa (Thermo Scientific), siguiendo las condiciones sugeridas por los fabricantes.

6.2.2. Digestión del ADN con enzimas de restricción

El ADN plasmídico se digirió utilizando enzimas de restricción tanto para obtener plásmidos y/o insertos para el clonado molecular, como para los mapeos de restricción. En todos los casos se utilizaron enzimas y *buffers* comerciales (New England Biolabs o Promega), siguiendo las especificaciones de cada proveedor. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa.

6.2.3. Desfosforilación de extremos compatibles

Los plásmidos con extremos romos o extremos cohesivos compatibles se trataron con la enzima fosfatasa alcalina SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Promega), para su desfosforilación. Se incubó el ADN con la enzima (1 unidad/ μg ADN) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Luego se inactivó la enzima mediante tratamiento térmico a 65°C durante 5 minutos.

6.2.4. Fosforilación de productos de PCR

Se realizó la fosforilación de fragmentos de PCR por tratamiento con la enzima quinasa T4PNK (New England Biolabs), siguiendo las especificaciones del proveedor. Se utilizó una proporción de 1 unidad/ 300 pmoles de extremos 5' del ADN. Se incubó a

37°C durante 30 minutos y luego se inactivó la enzima por tratamiento por calor a 65°C durante 20 minutos.

6.2.5. Rellenado de extremos 5' protruyentes

Para la modificación de sitios de restricción dentro de vectores o para clonar insertos con extremos romos, se rellenaron los extremos 5' protruyentes generados por la digestión previa con enzimas restricción. El relleno de los extremos se realizó por polimerización a través del tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN Polimerasa I (New England Biolabs). Los fragmentos digeridos se incubaron con la enzima polimerasa (1U/μg ADN) y 33 μM dNTPs a temperatura ambiente durante 15 minutos. La enzima se inactivó por tratamiento con calor a 75°C durante 20 minutos.

6.2.6. Purificación de plásmidos digeridos y fragmentos de ADN

Los productos de PCR, plásmidos digeridos y fragmentos de ADN se purificaron a partir del kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Los plásmidos y los fragmentos de ADN obtenidos de digestiones con enzimas de restricción se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa y las bandas de interés se escindieron del gel. Las bandas cortadas o los productos de PCR se sembraron en las columnas de sílica proporcionadas en el kit, siguiendo las especificaciones del fabricante.

6.2.7. Cuantificación del ADN

La cuantificación de ADN plasmídico y de los insertos se realizó mediante dos métodos complementarios. El primer método fue la medición de absorbancia por espectrofotometría de microvolumen utilizando el equipo Nanodrop. El segundo método fue la separación de las muestras de ADN en un gel de agarosa en simultáneo con una muestra de ADN plasmídico de masa conocida, y posterior cuantificación por comparación de intensidad de bandas utilizando el software Image J.

6.3 Reacciones de ligación

Las reacciones de ligación de plásmidos e insertos se hicieron utilizando la ADN ligasa del fago T4 (New England Biolabs). Se utilizó 50 ng de plásmido y relaciones molares de extremos plásmido:inserto variables entre 1:1 y 1:10. Para los casos de autoligación de un vector se utilizó 10 ng del mismo. La cantidad de enzima utilizada fue de 4 unidades enzimáticas por ng DNA. En cada caso se utilizó el *buffer* suministrado por el fabricante en un volumen final de 10 μl de reacción. Como controles, se realizó

una reacción sin el agregado del inserto y otra reacción en la cual no se agregó la enzima. Las reacciones se incubaron a 16°C durante toda la noche.

6.4 Reacciones de Golden Gate Assembly

Las reacciones de digestión y ligación se llevan a cabo en un mismo tubo, en ciclos sucesivos. Se utilizaron 100 ng de vector y una relación molar plásmido:inserto de 1:2. El vector y los insertos correspondientes se mezclaron con 5 unidades de la enzima de restricción BsaI (New England Biolabs) y 10 unidades de la enzima T4 ligasa (New England Biolabs). A la mezcla de reacción se le agregó el *buffer* proveído por el fabricante de la enzima T4 ligasa, y la proteína seroalbúmina bovina (BSA), en un volumen final de reacción de 20 µl. Se realizaron ciclos con temperaturas que favorecen la digestión (37°C) y temperaturas que favorecen la ligación (16°C). Se utilizó el siguiente patrón de ciclado: 20 segundos a 37°C, 26x(3 minutos a 37°C, 4 minutos a 16°C), 5 minutos a 50°C, 5 minutos a 80°C.

7. Transformación genética de plantas

7.1. Transformación del genoma plasmídico

7.1.1 Preparación de micropartículas de oro

Se mezclaron 30 mg de partículas de oro de 0.6 µm (BioRad) con 1mL de etanol 70% frío y se mezcló en un *vortex* (1000 r.p.m) durante 5 minutos. Luego de incubar a temperatura ambiente por 15 minutos, se centrifugó durante 1 minuto a 3000 g (4°C). Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 3 veces con 1 mL de H₂O estéril. El lavado consistió de los siguientes pasos: agregado de 1mL de H₂O estéril fría, resuspensión por *vortex* (1000 r.p.m), incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugación durante 1 minuto 3000 g (4°C). Luego del tercer lavado, la centrifugación se realizó a 5000 g durante 15 segundos. A continuación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 500 µL de glicerol 50% estéril, agitando con *vortex* (1000 r.p.m) durante 1 minuto. Se separó en alícuotas (50 µL) que se guardaron a -20°C previo a su uso.

7.1.2. Recubrimiento de las partículas de oro con ADN plasmídico

Se tomaron 50 µL de la preparación de micropartículas de oro y se resuspendieron por agitación con *vortex* (1000 r.p.m). Se agregó en orden secuencial y

agitando con *vortex* cada vez: 5 µg del plásmido de transformación, 50 µL de CaCl₂ 2,5 M y 20 µL de espermidina 0,1 M. Se agitó con *vortex* durante 5 minutos y luego se centrifugó 1 minuto a 3000 *g* a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, y se agregaron al pellet 140 µl de etanol 70% a temperatura ambiente, resuspendiendo por agitación. A continuación, se centrifugó a 1 minuto a 3000 *g* a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 140 µL de etanol absoluto frío. Luego de resuspender por agitación se centrifugó durante 15 segundos a 5000 *g* a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se repitió el último paso agregando 50 µL de etanol 100% frío. Los tubos se dejaron en agitación con *vortex* a 4°C hasta su utilización.

7.1.3. Bombardeo de micropartículas

Los macrotransportadores (*Macrocarriers*, BioRad), soportes para macrotransportadores (*Macrocarrier Holders*, BioRad) y discos de ruptura (1.100 psi *Rupture Disks*, BioRad), se esterilizaron por inmersión en etanol absoluto y se dejaron secar en el flujo laminar. Los macrotransportadores se ensamblaron en los soportes para macrotransportadores. Se cargaron aproximadamente 10 µL de las micropartículas de oro recubiertas del ADN plasmídico en los macrotransportadores y se dejaron secar en el flujo laminar.

Se colocaron hojas de *N. tabacum* cv Petit Havana germinadas *in vitro* con la cara abaxial hacia arriba sobre papel de filtro en placas de Petri con medio RMOP (medio MS, tiamina 1 mg/L, mio-inositol 100 mg/L, sacarosa 30 g/L, ANA 0,1 mg/L, BAP 1 mg/L, agar 0,8 %). Para el bombardeo se utilizó el dispositivo para biobalística *PDS-1000/He Particle Delivery System* (BioRad). Por cada disparo se empleó un disco de ruptura, el cual se sumergió en isopropanol y se ensambló en la rosca soporte (*Rupture Disk Retaining Cap*) sellando la cámara de alta presión de helio. Se colocaron una malla de detención (*Stopping Screen*, BioRad) y el macrotransportador cargado con la mezcla de partículas de oro y ADN, en la bandeja de detención (*Stopping Plate*). Las distancias utilizadas fueron de 0,625 cm entre el disco de ruptura y el macrotransportador, y de 11 mm entre el macrotransportador y la malla de retención. La bandeja con la placa de *petri* conteniendo la hoja a bombardear se colocó a una distancia de 9 cm. Se cerró la cámara y se hizo vacío hasta alcanzar una presión de 28 mm Hg. Luego se permitió el ingreso de helio con una presión de 1100 psi hasta romper el disco de ruptura, para luego liberar la presión de vacío. Como control, en el primer disparo se utilizó un macrotransportador no cargado con micropartículas.

Luego del período de incubación, se cortaron las hojas en trozos quitando la nervadura central utilizando un bisturí y se colocaron con la cara abaxial hacia abajo en medio RMOP con espectinomicina (500 mg/mL). La hoja bombardeada con el macrotransportador sin micropartículas se cortó y los trozos se colocaron en una placa con medio RMOP (control de regeneración) y RMOP con espectinomicina (500mg/mL) para el control de selección. Las placas fueron incubadas a 26°C en un fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad durante aproximadamente 1 mes. Los brotes regenerantes se transfirieron a un medio MS suplementado con 3% sacarosa y espectinomicina (500 mg/mL) para favorecer la formación de raíces. Las plantas que desarrollaron raíces se sometieron a dos rondas sucesivas de regeneración. Para las rondas de regeneración, se cortaron trozos de hoja, se cultivaron en medio con RMOP con antibiótico durante 1 mes y se transplantaron los brotes regenerantes a medio MS con antibiótico.

7.1.4. Rusticación

Las plantas de tercera ronda de regeneración se rusticaron para la obtención de semillas. Para su pasaje a tierra, las raíces de cada planta se lavaron cuidadosamente con agua corriente para eliminar los restos de medio y se plantaron en macetas conteniendo una mezcla 3:1:1 de humus, turba y perlita. Durante la primera semana, las plantas se mantuvieron cubiertas con un *film* de polietileno para evitar su deshidratación en el proceso de adaptación a las nuevas condiciones de humedad. El crecimiento se hizo en un cuarto de cultivo cerrado con un fotoperíodo de 14/10 horas luz/oscuridad y a una temperatura de 25-30°C.

7.1.5 Esterilización y germinación *in vitro* de plantas de *N. tabacum*

Para la esterilización de semillas de *N. tabacum*, se sumergieron las semillas en etanol 70 % durante 1 minuto y luego se incubaron 3 minutos en una solución de lavandina comercial en una dilución 1:10. A continuación, se realizaron 3 lavados con H₂O estéril durante 5 minutos cada uno. Las semillas se secaron y sembraron en medio MS sólido con o sin antibiótico. Las plantas *in vitro* se crecieron con un fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad a 26°C.

7.2 Agroinfiltración con *A. tumefaciens*

Se crecieron colonias de *A. tumefaciens* en medio LB sólido suplementado con rifampicina (0,1 mg/mL) y gentamicina (0,05 mg/mL), y el antibiótico correspondiente según el vector de transformación. Las placas de *petri* se cultivaron durante 48 horas a 28°C. Luego se tomó una fracción del cultivo y se resuspendió en 1mL de agua mediante

agitación con *vortex* (1000 r.p.m). Se centrifugó durante 5 minutos a 3000 r.p.m y se descartó el sobrenadante. Se realizó un lavado con 1 mL de agua, y se centrifugó durante 5 minutos a 3000 *g*. El precipitado se resuspendió en 1 mL de *buffer* de infiltración (MES 10 mM pH=5,6, MgCl₂ 10 mM, acetosiringona 500 µM). Las suspensiones celulares se diluyeron en *buffer* de infiltración hasta llegar a la D.O₆₀₀ correspondiente a cada experimento. En casos de co-infiltración, se prepararon las suspensiones celulares mezclando las bacterias transformadas con cada construcción. La suspensión se cargó en jeringas de 1 mL (sin aguja) con las que se ejerció presión sobre la cara abaxial de hojas jóvenes expandidas, a fin de forzar la entrada de las bacterias al espacio intercelular. Al cabo de 4 a 7 días se evaluó la expresión del transgen de interés.

8. Análisis de ADN

8.1. Extracción de ADN total de plantas para análisis por PCR

Se molieron 4 discos de hoja utilizando un vástago de plástico de punta cónica y se agregaron 350 µL de *buffer* de extracción EB (TrisHCl 50 mM pH=8, EDTA pH=8 10mM, NaCl 100 mM, 1% SDS, β-mercaptoetanol 10 mM). Se resuspendió por agitación y se incubó a 65°C durante 10 minutos. Luego se agregaron 100 µL de acetato de potasio 3 M (pH=5,5) frío, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 20 minutos. A continuación, se centrifugó durante 10 minutos a 13000 *g* (4°C) y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Para la precipitación del ADN, se agregó 1 volumen de isopropanol y se centrifugó durante 15 minutos a 13.000 *g* a temperatura ambiente. Se agregó 500 µL de etanol 80%, se centrifugó 5 minutos a 13.000 *g* a temperatura ambiente y se dejó secar el precipitado a 37°C con la tapa abierta. El precipitado se resuspendió en 50 µL de H₂O bidestilada. Por último, se agregó 1 µL de RNAsa y se incubó durante 30 minutos a 37°C. La integridad del ADN extraído se verificó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa.

8.2. Purificación de ADN total para análisis por Southern blot

Se utilizó una modificación del protocolo de purificación de ADN desarrollado por Dellaporta (Dellaporta y col.,1983). Se molió 1 gramo de tejido vegetal fresco con nitrógeno líquido en un mortero hasta formar un polvo fino. Se agregaron 5 mL de *buffer* CTAB (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH=8 , EDTA disódico pH=8 20 mM y β-mercaptoetanol 0,2 %) precalentado a 65°C. Se incubó a esa misma temperatura entre

30-60 minutos, agitando cada 10 minutos. Posteriormente, se agregó un volumen de cloroformo y se agitó por *vortex*. Se centrifugó a 5000 *g* durante 10 minutos (4°C) y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. A continuación, se repitió la extracción con cloroformo. Se agregó RNasa A (100 µg/mL) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Luego de la incubación se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol frío y se mezcló suavemente por inversión. Se centrifugó durante 20 minutos a 10.000 *g* y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol 70%, se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 *g* a temperatura ambiente y se dejó secar a 37°C con el tubo abierto. Para la resuspensión, se agregó 1 mL de H₂O bidestilada y se incubó durante toda la noche a 4°C.

8.3. Evaluación de la integración del transgen por PCR

La integración del ADN en el genoma plasmídico se verificó por amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores Cloro_Fw, que hibrida en una región de la secuencia del ARNr 16S, y Cloro_RV, que hibrida con el gen *aadA*. Se utilizó como molde 0,5 µl de muestra de ADN total extraído según *sección 6.1*. Para la reacción de PCR se agregó 150 ng de cada oligonucleótido iniciador, 1,25 unidades de *easyTaq* polimerasa (transgen Biotech), 0,4 mM de dNTPs y el *buffer* suministrado con la enzima (conteniendo MgCl₂). Se utilizó un termociclador *Mastercycler* (Eppendorf) según el siguiente patrón de ciclado: 5 minutos a 94°C, 30x(1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto 30 segundos a 72°C), 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1%.

8.4 Southern blot

8.4.1. Digestión del ADN

Extracciones de ADN total (3,5 µg) de las plantas transplastómicas o no transformadas se incubaron durante una hs con la enzima NcoI a una concentración de 10U/µg ADN, utilizado el *buffer* sugerido. Se agregó espermidina (Sigma Chemical) a una concentración final de 1 mM y se incubó a 37°C, durante toda la noche.

8.4.2. Electroforesis y transferencia a membrana de Nylon

El ADN cortado se separó por electroforesis en geles de agarosa 0,8 % en TAE 1X, a 30 mA de corriente constante durante toda la noche. Al finalizar la corrida se tiñó el gel con bromuro de etidio (0,5 µg /mL) para la visualización del ADN. A continuación, se lavó con H₂O bidestilada durante 30 minutos. Para la depurinización, se incubó el gel

con HCl 0,25 M durante 10 minutos y luego se lavó en H₂O bidestilada durante 5 minutos. Luego se incubó con 10 volúmenes de solución desnaturalizante (NaOH 0,4 M, NaCl 1,5 M) durante 20 minutos con agitación suave. El ADN se transfirió por capilaridad con SSC 10X (NaCl 1,5M, 0,15 M citrato de sodio, pH=7) a membranas de *nylon Hybond N+* (GE Healthcare) durante toda la noche. Luego de la transferencia, se realizó el *crosslinking* del ADN a la membrana por medio de radiación UV utilizando el equipo *UV Stratalinker 1800* en seteo *autocrosslink*.

8.4.3. Hibridación, detección y revelado

Para la detección se utilizó el Kit comercial *DIG DNA Labeling and Detection KIT* (Roche). Este kit se basa en la marcación de sondas con Digoxigenin-11-dUTP y la detección utilizando un anticuerpo específico anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina. Para la detección, se siguieron las especificaciones del fabricante, con leves modificaciones.

La membrana de *Nylon* se incubó en 15 mL de *buffer* de pre-hibridación (Dig Easy Hyb) a 48°C durante 2 horas, utilizando un horno rotatorio. En paralelo, se desnaturalizó la sonda por calor, incubando 20 minutos a 68°C. Para la hibridación se incubó durante toda la noche con la sonda TrnI/A desnaturalizada, utilizando un horno rotatorio a 48°C.

Finalizada la hibridación, se recuperó la solución con la sonda y se realizaron dos lavados consecutivos de la membrana durante 10 minutos con 50 mL de *buffer* SSC2X (NaCl 0,3 M, citrato de sodio 30 mM pH=7) con SDS 0,1%. Luego se realizaron 3 lavados sucesivos de 15 minutos con *buffer* SSC 0,1X (NaCl 15 mM, citrato de sodio 1,5 mM pH=7) con SDS 0,1% a 68°C utilizando un horno giratorio. A continuación, se lavó la membrana con *buffer* de ácido málico (NaCl 150 mM, ácido málico 100 mM, pH 7,5) durante 3 minutos a temperatura ambiente. Para el bloqueo, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 mL de *buffer* de bloqueo 1X (Roche) con agitación suave. Luego se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-DIG (1:10000) proporcionado por el fabricante. Al finalizar, se realizaron dos lavados consecutivos con *buffer* de lavado (NaCl 150 mM, ácido málico 100 mM, Tween 20 0,3%, pH 7,5) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Para el revelado, se estabilizó la membrana durante 5 minutos en *buffer* de detección (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM pH=9,5) y se agregó el sustrato colorimétrico CSPD ready-to-use cubriendo la totalidad de la membrana. Luego de una incubación

durante 5 minutos a 37°C, se realizó la captura de las imágenes utilizando el equipo *GeneGnome* (Syngen).

8.4.4. Preparación y marcación de la sonda

Se realizó la marcación mediante una reacción de PCR utilizando una mezcla de deoxinucleótidos trifosfato conteniendo digoxigenin-deoxyuridine triphosphate (dUTP), según las especificaciones del kit comercial *DIG DNA Labeling and Detection KIT* (Roche). Se utilizó como molde el fragmento trnA/I obtenido por digestión del plásmido pBS16S-23S (Segretin, 2009) y los oligonucleótidos iniciadores específicos aadA_nb_Fw y aadA_nb_Rv. La reacción de marcación por PCR se realizó siguiendo el siguiente patrón: 5 min a 95°C, 35x(1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto a 72 °C) y 10 minutos a 72°C.

9. Análisis de proteínas

9.1. Extracción de proteínas de plantas

9.1.1. Extracción de proteínas solubles

Para la extracción de proteínas solubles totales se trituraron manualmente aproximadamente 25 miligramos de hojas de *N. tabacum* o *N. benthamiana* en 125 µL de *buffer* Laemmli 1X (Laemmli, 1970) utilizando un vástago de plástico de punta cónica. Las muestras se calentaron a 98°C durante 10 minutos y se centrifugaron a 13.000 g por 10 minutos, recuperando el sobrenadante

9.1.2. Extracción de proteínas totales de plantas transplastómicas

Para la extracción de proteínas totales, se molió 1 gramo de tejido vegetal fresco en un mortero utilizando nitrógeno líquido y se agregaron 2 mL de *buffer* de extracción (PBS 1X pH 7,4, Triton 2% p/p, β-mercaptoetanol 100mM). Se tomó una alícuota de 500 µL de la fracción total y el resto de la suspensión se centrifugó durante 15 minutos a 13.000 g (4°C), recuperando el sobrenadante (fracción soluble). El precipitado (fracción insoluble) se lavó con agua, se centrifugó 5 minutos a 13.000 g (4°C) y se resuspendió en *buffer* de extracción.

9.1.3. Purificación de rhFGFb por Cromatografía de Afinidad con Metal Inmovilizado (IMAC)

Se molieron 3 gramos de tejido vegetal fresco en nitrógeno líquido utilizando un mortero y se agregaron 6 mL de *buffer* de extracción (PBS 1X pH=7,4, Triton 2% p/p, β -mercaptoetanol 100 mM). La suspensión se centrifugó durante 15 minutos a 13.000 *g* a 4°C, separando la fracción soluble (FS) y la fracción insoluble (FI). La FI se resuspendió en 6 mL de PBS 1X. La FS se concentró por filtración tangencial utilizando un filtro Amicon Ultra 10 kDa (Merck, Alemania). La muestra concentrada se diluyó en 1 mL del *buffer* de equilibrio (*buffer* sodio fosfato 50 mM pH=8, NaCl 300 mM, inhibidores de proteasas cOmplete™ 1mM (Roche Molecular Systems)).

La purificación de rhFGFb se realizó por cromatografía de afinidad utilizando una resina de níquel-NTA en un sistema de flujo por gravedad, con columnas de fabricación casera. Entre 0,8 y 0,9 mL de resina *HIS-Select® Nickel Affinity Gel* (Sigma Aldrich) fueron empaquetados en jeringas de tuberculina (1 mL), equilibrando la columna mediante el pasaje por flujo por gravedad de 2 mL de *buffer* de equilibrio (*buffer* sodio fosfato 50 mM pH=8,0, NaCl 300 mM). El extracto de proteínas FS se cargó en la columna, recolectando la fracción no unida (percolado). La columna se lavó entonces 4 veces con 500 μ L de *buffer* de lavado (*buffer* sodio fosfato 50 mM pH=8, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM) (fracciones L1 a L4) y la muestra se eluyó en 4 pasos consecutivos con 500 μ L de *buffer* de elución (*buffer* sodio fosfato 50 mM, pH 8,0, 300 NaCl mM, imidazol 250 mM) (Fracciones E1 a E4). Al finalizar, la resina se lavó con *buffer* de equilibrio y se conservó en 30 % etanol.

El eluido E3 se esterilizó por filtración con una jeringa de 0,22 μ M y la muestra se cargó en un filtro esterilizado Amicon Ultra de 10 kDa (Merck, Alemania) para intercambiar el *buffer* por PBS 1X con 0,1 % BSA libre de endotoxinas (*buffer* de similares características al comercial).

9.1.4. Cuantificación de proteínas solubles totales

Se cuantificaron las proteínas solubles totales presentes en la fracción soluble (FS) mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976) utilizando un reactivo comercial (Sigma Aldrich). Como estándar se utilizó una curva realizada con distintas concentraciones de Albúmina Sérica Bovina (Sigma Chemical).

9.1.5 Cuantificación de rhFGFb

Para la cuantificación de rhFGFb soluble y el rhFGFb purificado, se compararon distintas fracciones del protocolo de purificación con una dilución seriada de rhFGFb comercial (Gibco, PHG0026) por *western blot* seguido de un análisis por densitometría. La intensidad de las bandas fue analizada mediante el software Image J.

9.2. Electroforesis de proteínas

9.2.1. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se prepararon geles de poliacrilamida desnaturalizantes (15-17%) de 10 x 10 cm x 1,5 mm de espesor, utilizando el sistema armador *SE 260 Mini Vertical Unit* (Hoeffer) y de acuerdo a los protocolos publicados (Sambrook *et al*, 1989). Previo a la siembra, las muestras se prepararon en *buffer* Laemmli 1X y se desnaturalizaron por calor (98°C) durante 5 minutos. La electroforesis se realizó a 30 mA constantes en *buffer* Tris-Glicina (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1 %), utilizando el sistema *Mini Protean III* (BioRad).

9.2.2. Tinción de proteínas totales con Coomassie brilliant blue

Los geles se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche en solución de tinción (*Coomassie brilliant blue* R250 0,05 %, metanol 40 %, ácido acético 10 %). Luego se cambió la solución por solución de lavado 1 (metanol 50 %, ácido acético 10 %) y se incubó a temperatura ambiente por 12-24 horas. Por último, se reemplazó por la solución de lavado 2 (metanol 10%, ácido acético 10%).

9.2.3. Western blot

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa *Hybond C* (Amersham Biosciences) mediante el sistema de transferencia *Mini Trans-blot* (BioRad). La transferencia se llevó a cabo mediante la aplicación de una corriente constante de 90V constantes durante 1 hora, en *buffer* de transferencia (Tris-HCl 50 mM pH=7,5, glicina 196 mM, metanol 20%). Finalizada la transferencia, la membrana se tiñó con el colorante *rojo ponceau* incubando 10 minutos a temperatura ambiente.

Para el bloqueo se incubó la membrana en solución de bloqueo conteniendo *buffer* TTBS (Tris-HCl 50 mM pH=8, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 % v/v) con 5% leche descremada o 1% Albumina Sérica Bovina. La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C o durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación suave. Luego

se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario *monoclonal mouse anti-HIS6 tag* (1:3000) (Roche Molecular Systems, Inc., USA) o *monoclonal rabbit anti-FGF* (1:3000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA), ambos preparados en TTBS 1% BSA. A continuación se realizaron 3 lavados consecutivos con TTBS a temperatura ambiente durante 5 minutos cada uno. Luego se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente, anti-mouse AP (1:3000) (Sigma Aldrich), o anti-rabbit AP (1:1000) (Cell Signaling Technology), respectivamente. Ambos anticuerpos fueron preparados en TTBS 5% leche. Se realizaron 3 lavados consecutivos con TTBS durante 5 minutos y un lavado de 10 minutos con *buffer* fosfatasa (Tris-HCl 100 mM pH=9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM).

La presencia de las proteínas se reveló por visualización de la actividad de la fosfatasa alcalina (AP) conjugada a los anticuerpos secundarios utilizando como sustrato cromogénico una mezcla de NBT (Nitroblue tetrazolium, Biorad) y BCIP (5 bromo-4 cloro-3 indoil fosfato, Genbiotech). Cada membrana se reveló en oscuridad con 10 mL de *buffer* fosfatasa conteniendo 100 μ L BCIP (20 mg/mL en DMSO 70%) y 100 μ L de NBT (30 mg/mL, en DMSO 100%).

10. Evaluación de la actividad biológica de rhFGFb

10.1. Cultivo de células HEK293T

La línea celular HEK 293T (RRID:CVCL_0063) se adquirió de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se mantuvo congelada en nitrógeno líquido. La contaminación por micoplasma se evaluó mensualmente mediante PCR. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 μ g/ml y L-glutamina 2 mM (Life Technologies, Inc.) en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C.

10.2. Ensayo de proliferación

Se sembraron 500 células en placas de 96 pocillos y luego de 24 horas se incubó con 5 ng/mL de rhFGFb purificado (rhFGFb vegetal). Como control positivo se estimuló con 5 ng/mL de hFGFb comercial (Gibco, PHG0026) y como control negativo se utilizó un extracto de planta no transformada (NT). Las células se incubaron a 37°C en una incubadora con CO₂ al 7,0 % durante 24 horas. Para la medición de proliferación se empleó el método de tinción con resazurina, complementando el medio con 10 % con

resazurina 30 μM (Sigma Aldrich). Al cabo de 2 horas de incubación, se midió la fluorescencia (550 nm excitación, 590 nm emisión) con un lector de placas multimodo EnSpire® (Perkin-Elmer). Para el análisis estadístico se realizó un Anova seguido de una comparación múltiple de Dunnet.

11. Medición de parámetros fotosintéticos

Se sembraron en tierra semillas de las distintas líneas y las plantas se crecieron en cuarto de cultivo cerrado con un fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad a 25°C. Se midió la fluorescencia de la clorofila utilizando el fluorómetro Photosynq Multispeq. Para las mediciones de F_v y F_m , las plantas fueron sometidas a un tratamiento previo en oscuridad durante 30 minutos. Todas las mediciones fueron realizadas sobre la segunda hoja expandida. El análisis estadístico se realizó mediante un ajuste a una variable de tipo *beta* y un análisis post-hoc comparando la línea NT vs las distintas líneas UTR.

12. Cuantificación de clorofila

12.1. Cuantificación de Unidades SPAD

Las unidades SPAD se midieron utilizando un medidor de clorofila portátil (Clorofilio®, Cavadevices) o el fluorómetro Photosynq. El análisis estadístico se realizó mediante el ajuste a un modelo lineal de efectos mixtos y un análisis de comparación de medias (Tuckey).

12.2. Medición de clorofila total

La medición de clorofila total se realizó por espectrofotometría UV siguiendo el protocolo establecido por Hiscox e Israelstam (Hiscox and Israelstam, 1978). Se tomaron aproximadamente 20 miligramos de hoja y se incubaron en 1 mL de DMSO a 65°C durante 90 minutos o hasta que el tejido se viera translúcido. Se midió la absorbancia de la clorofila A (663 nm) y la clorofila B (645 nm). La concentración de clorofila total se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$[\text{Chl total}] \text{ (mg/ L)} = 37 \cdot A_{645} + 14,82 \cdot A_{663}$$

El análisis estadístico se realizó mediante un modelo lineal de efectos mixtos, tanto para el contenido de clorofila total como para la relación clorofila a/b. Se realizó un análisis de comparación de medias y test de Tuckey.

13. Análisis de localización subcelular por microscopía confocal

Para el estudio de localización subcelular de proteínas por microscopía confocal, se agroinfiltraron las siguientes construcciones: pEAQ-HT-GFP, pEAQ-GFPAP, pEAQ-GFPKDEL y pEAQ-mKOVAC. Cada construcción se co-infiltró con un marcador de localización subcelular previamente caracterizado. Se utilizó para cada una de las concentraciones una DO_{600} de 0,2.

Luego de 3 días post-infiltración, se tomaron discos de hoja con un sacabocados y se montaron sobre un cubreobjetos en medio de montaje Carolina®. Las células de la epidermis de la hoja se visualizaron en un microscopio confocal Leica TCS SPE, utilizando un objetivo de 40X. Para visualizar la proteína GFP se utilizó un láser de 488 nm y se registró una emisión a 509 nm. Para la visualización de las proteínas RFP o mKO se utilizó un láser de 532nm, registrando una emisión a 607nm y 563 nm, respectivamente. La autofluorescencia se visualizó utilizando un láser de 523 nm y registrando una emisión de entre 650-750 nm. El análisis de imágenes se realizó mediante el software Image J.

14. Sistema de expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*

14.1. Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa GS115 his4⁻ (Invitrogen Life Technologies) de *P. pastoris*, auxótrofa para histidina. Para el cultivo líquido se utilizó medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona de caseína 1%, dextrosa 2%) y se incubaron a 28°C en agitación (220 r.p.m). Para el mantenimiento en medio sólido se utilizó medio YPD con 2% Agar y se incubó en estufa a 28°C.

14.2 Preparación de células electrocompetentes de *P. pastoris*

Se inoculó una colonia aislada de *P. pastoris* en 5 mL de medio YPD y se creció durante la noche en agitación (220 r.p.m) a 30°C. Luego se inocularon 2 mL del cultivo en 100 mL de YPD líquido y se incubó a 30°C con agitación hasta alcanzar una $D.O_{600}$ entre 1,2 y 2. A continuación, se realizaron 2 centrifugaciones sucesivas a 1500 g

durante 5 minutos 4°C. En ambos casos se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 100 mL (primera centrifugación) o 50 mL (segunda centrifugación) de agua estéril fría, agitando suavemente. A continuación, se realizó otra centrifugación bajo las mismas condiciones, y el precipitado se resuspendió con agitación suave en 5 mL de sorbitol 1M estéril a 4°C. Por último, se volvió a centrifugar bajo mismas condiciones y se resuspendió el precipitado en 500 µL de sorbitol 1M estéril. Inmediatamente después de su preparación, las levaduras electrocompetentes se utilizaron para la transformación genética.

14.3 Transformación genética de *P. pastoris*

14.3.1 Linealización del ADN plasmídico

El ADN plasmídico (10-20 µg) se incubó con las enzimas SacI o BglII utilizando el *buffer* proporcionado por el fabricante, durante 2 horas a 37°C. La digestión del plásmido se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa (1%). El plásmido linealizado se purificó por columna utilizando un kit comercial (DSBIO).

14.3.2 Transformación por electroporación

Se incubaron 100 µL de células electrocompetentes con 10 µg del ADN plasmídico linealizado, durante 5 minutos en hielo. La preparación se transfirió a cubetas de electroporación de 0,2 cm previamente enfriadas y se le aplicó un pulso eléctrico de 1,5 Kv mediante un electroporador modelo “Micropulser” (BioRad), utilizando el programa SC2. A continuación, se resuspendieron las células en 1 mL de sorbitol 1M estéril y se plaquearon en medio mínimo MD sólido (YNB 0,34%, (NH₄)₂SO₄ 1%, dextrosa 2%, Agar 1,5%) suplementado con biotina 4x10⁻⁵ %. Las placas se incubaron a 30°C durante 48-72 horas. Los clones recombinantes se seleccionaron por su capacidad de crecimiento en medio mínimo, por complementación de la auxotrofia.

14.4 Análisis de ADN genómico de *P. pastoris*

14.4.1 Colony PCR para *P. pastoris*

A partir de las placas obtenidas de la transformación genética, se tomó una colonia y se resuspendió en 100 µL de H₂O bidestilada. Se incubó con 70 unidades de la enzima litica durante 1 hora a 37°C. A continuación se inactivó la enzima por tratamiento térmico de 5 minutos a 100°C seguida de una incubación en hielo inmediatamente después. Las muestras se centrifugaron a 13.000 g durante 1 minutos

y se utilizó 15 μ L del sobrenadante como molde para una reacción de PCR con oligonucleótidos iniciadores específicos (5AOX1_Fw y 3AOX1_Rv), utilizando la Taq polimerasa casera. Se utilizó el siguiente patrón de ciclado: 5 minutos a 95°C, 30 x (30 segundos a 95°C, 30 segundos a 63°C, 2,5 minutos a 72°C), 10 minutos a 72°C.

14.5. Producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*

14.5.1. Fase de Proliferación

Se realizó un pre-inóculo a partir de colonias aisladas de los clones recombinantes en 5 mL de medio BMGY líquido (tabla 8). El cultivo se incubó durante toda la noche en agitación (220 r.p.m) a 28°C. A continuación, se inocularon 2 mL del cultivo en 25 mL de medio BMGY y se incubó a 28°C en agitación durante 48 horas.

14.5.2. Fase de Inducción

Para la fase de inducción, las células del cultivo de 48 horas se colectaron por centrifugación durante 5 minutos a 1500 g, seguida de la cual se resuspendieron y diluyeron en 50 mL de medio BMMY (tabla 8) para alcanzar una $D.O_{600} = 10$ (o sus variantes según el ensayo). El cultivo se incubó durante 4-7 días a 28°C (o sus variantes) y con agitación con el agregado de metanol 0,5% final (o sus variantes) cada 24 horas. Para los ensayos de co-alimentación, además de metanol, se hizo un agregado de D-sorbitol 3% final cada 48 horas. En todos los casos se tomó una muestra de 1 mL del cultivo a T0 (pre-inducción) y muestras equivalentes cada 24 horas, separando las células de los sobrenadantes de cultivo por centrifugación a 1500 g por 5 minutos. Los pellet de células se resuspendieron en 1 mL de H₂O bidestilada y todas las muestras se conservaron a -20°C para su posterior electroforesis en geles de poliacrilamida y análisis por *western blot* (secciones 9.2.1 y 9.2.3).

	BMGY	BMMY
Extracto de levadura	1%	1%
Peptona de caseína	2%	2%
YNB (base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos)	0,34%	0,34%
(NH₄)₂SO₄	1%	1%
Buffer fosfato de potasio pH 6,0 o 5,5	100 mM	100 mM
Biotina	4x10 ⁻⁵ %	4x10 ⁻⁵ %
Glicerol	4% V/V	--

Tabla 8. Composición de los medios de cultivo utilizados para la producción de proteínas recombinantes.

Anexo

Obtención del vector pEAQ-Golden

1. Adaptación del vector pEAQ-HT para el clonado por Golden Gate Assembly

Con el objetivo de generar un sistema de clonado rápido para expresar de forma transitoria proteínas fusionadas a distintas señales de localización subcelular, adaptamos el vector pEAQ-HT-GFP (Sainsbury et al, 2009) para el clonado por *Golden Gate Assembly*. La adaptación del vector incluyó dos pasos:

1. Eliminación de sitios de Bsal presentes en el esqueleto del vector pEAQ-HT-GFP
2. Incorporación de una secuencia *polylinker* conteniendo los sitios de reconocimiento de Bsal, río abajo del promotor 35S.

A continuación se detallarán los pasos para la obtención del vector pEAQ-Golden.

1.1 Introducción de mutaciones sinónimas dentro del gen P19

Se procedió a eliminar los sitios de reconocimiento de la enzima Bsal presentes en el esqueleto del vector pEAQ-HT-GFP, específicamente en el gen de supresión de silenciamiento P19. Dado que la proteína supresora P19 es fundamental para la expresión transitoria de genes foráneos en células vegetales, la modificación se realizó de forma tal de no alterar la secuencia proteica. Para ello, se sintetizó una región de P19 con mutaciones sinónimas en los sitios de reconocimiento para Bsal, teniendo en cuenta la frecuencia de uso de codones para *Nicotiana benthamiana*. La secuencia sintética (P19*) incluyó los sitios de reconocimiento de las enzimas HindIII (5') y SacI (3'), como se muestra en la figura A1.

P19	ATG GAA CGA GCT ATA CAA GGA AAC GAC GCT AGG GAA CAA GCT AAC
P19	AGT GAA CGT TGG GAT GGA GGA TCA GGA GGT ACC ACT TCT CCC TTC
P19	AAA CTT CCT GAC GAA AGT CCG AGT TGG ACT GAG TGG CGG CTA CAT
P19	AAC GAT GAG ACG AAT TCG AAT CAA GAT AAT CCC CTT GGT TTC AAG
P19	GAA AGC TGG GGT TTC GGG AAA GTT GTA TTT AAG AGA TAT CTC AGA
P19	TAC GAC AGG ACG GAA GCT TCA CTG CAC AGA GTC CTT GGA TCT TGG
	HindIII
P19ΔBsa	AA GCT TCA CTG CAC AGA GTC CTT GGA TCT TGG
P19	ACG GGA GAT TCG GTT AAC TAT GCA GCA TCT CGA TTT TTC GGT TTC
P19ΔBsa	ACG GGA GAT TCG GTT AAC TAT GCA GCA TCT CGA TTT TTC GGT TTC
P19	GAC CAG ATC GGA TGT ACC TAT AGT ATT CGG TTT CGA GGA GTT AGT
P19ΔBsa	GAC CAG ATC GGA TGT ACC TAT AGT ATT CGG TTT CGA GGA GTT AGT
P19	ATC ACC GTT TCT GGA GGG TCT CGA ACT CTT CAG CAT CTC TGT GAG
P19ΔBsa	ATC ACC GTT TCT GGA GGA TCT CGA ACT CTT CAG CAT CTC TGT GAG
P19	ATG GCA ATT CGG TCT AAG CAA GAA CTG CTA CAG CTT GCC CCA ATC
P19ΔBsa	ATG GCA ATT CGG TCT AAG CAA GAA CTG CTA CAG CTT GCC CCA ATC
P19	GAA GTG GAA AGT AAT GTA TCA AGA GGA TGC CCT GAA GGT ACT GAG
P19ΔBsa	GAA GTG GAA AGT AAT GTA TCA AGA GGA TGC CCT GAA GGT ACT GAA
P19	ACC TTC GAA AAA GAA AGC GAG TAA GGGGAGCTC
	SacI
P19ΔBsa	ACC TTC GAA AAA GAA AGC GAG TAA GGGGAGCTC

Figura A1. Secuencia P19 y P19*. Se muestra el alineamiento de la secuencia del gen P19 del vector pEAQ-HT-GFP (negro) y la secuencia sintética P19* (azul). Se muestran los sitios de reconocimiento de la enzima BsaI (rojo) y las mutaciones sinónimas en la secuencia P19* (amarillo).

Se reemplazó la secuencia P19 del vector pEAQ-HT-GFP con la secuencia sintética P19*, siguiendo los pasos de clonado que se detallan a continuación. En primer lugar, sub-clonamos una región de la secuencia codificante el gen P19 en el vector intermediario pZeroM. El vector pZeroM es una adaptación del vector comercial pZero2, al cuál le eliminamos los sitios de reconocimiento de las enzimas HindIII y SacI. Se digirió el vector pEAQ-HT-GFP con las enzimas BamHI y NotI y se purificó un fragmento de 4027pb, denominado HTP19, que contenía el gen P19. A continuación, clonamos el

fragmento HTP19 en los sitios BamHI y NotI del vector pZeroM, obteniendo el vector pZeroM-HTP19 (figura A1).

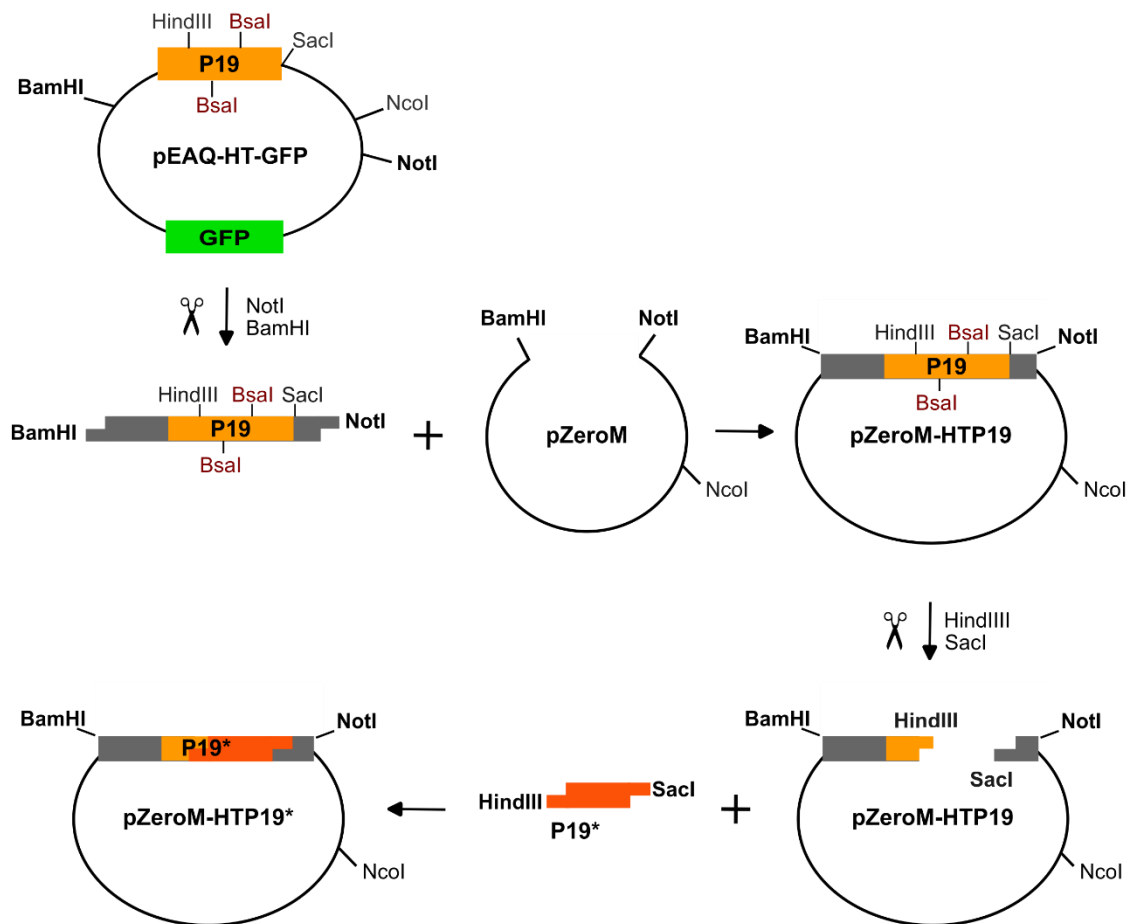


Figura A2. Esquema de clonado para la obtención del vector pZeroM-HTP19*

A continuación, clonamos la secuencia sintética P19* en los sitios HindIII y SacI del vector pZeroM-HTP19. De esta manera, se reemplazó la secuencia del P19 endógena por la secuencia sintética P19* (figura A2). Por último, se sub-clonó el fragmento P19* en los sitios BamHI y NotI del vector pEAQ-HT-GFP, obteniendo el vector pEAQ-HT-P19*

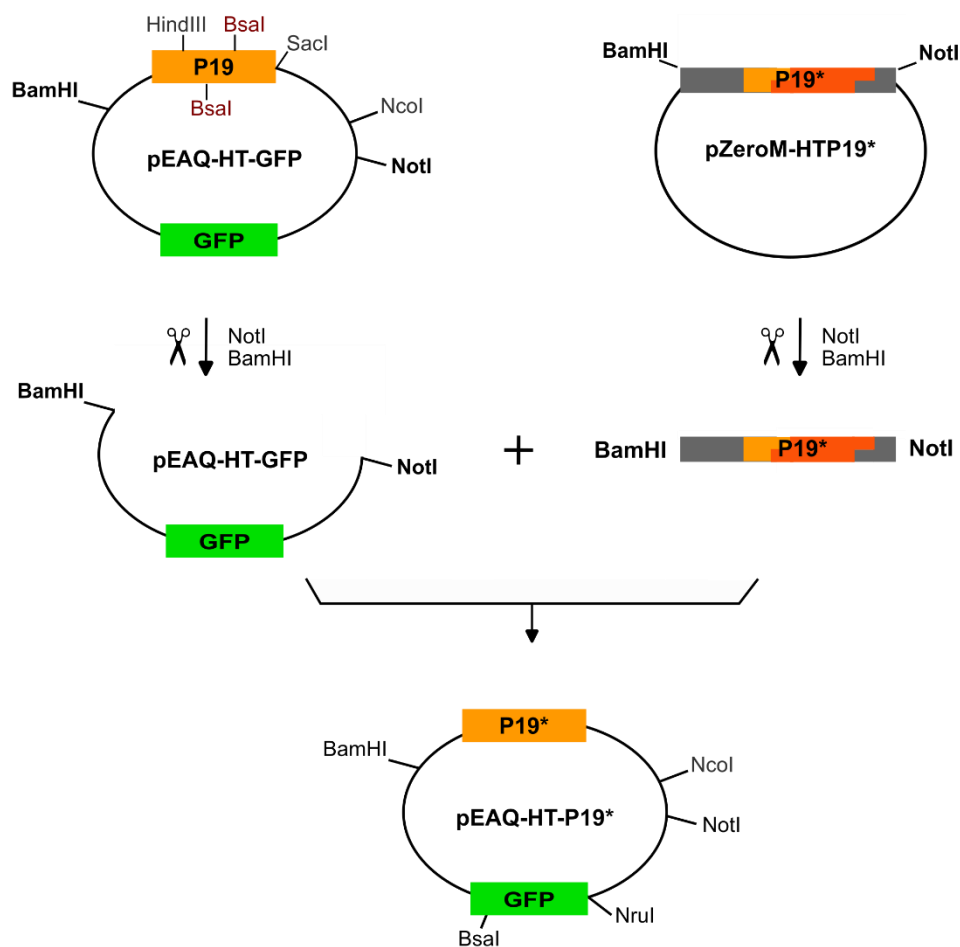


Figura A3. Esquema de clonado para la obtención del vector pEAQ-HT-P19*.

1.2 Clonado de secuencia *polylinker* con sitios *Bsal*

La secuencia *polylinker* ccdB-gg consiste en una versión truncada del gen que codifica para la toxina ccdB, flanqueada por sitios de restricción de *Bsal*. Para obtener el vector pEAQ-Golden, amplificamos la secuencia ccdB-gg mediante PCR a partir del vector pUTR-CCDB y la sub-clonamos en los sitios de restricción *NruI* (5') y *XhoI* (3') del vector pEAQ-HT-P19*.

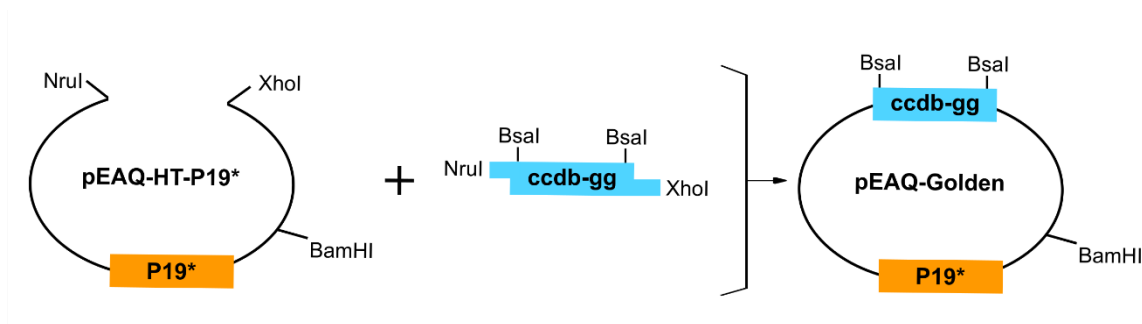


Figura A4. Obtención del vector pEAQ-Golden.

2. Diseño de las señales de localización subcelular

Se diseñaron los módulos correspondientes a las distintas señales de localización subcelular, incorporando los sitios de restricción BsaI y las bases adecuadas para generar extremos 5' libres compatibles para el clonado direccional.

A continuación, se detallan las distintas señales de direccionamiento utilizadas:

-Péptido señal N-terminal: Se utilizó la secuencia nucleotídica del péptido señal de la osmotina de tabaco AP24. Se sintetizó la secuencia por PCR a partir del plásmido pHap12 utilizando los primers AP24SSFW y AP24SSRV que incluyen el sitio de corte BsaI. El primer AP24SSFW incluye las bases para generar del extremo 5' libre complementario al extremo libre del vector pEAQ-Golden.

-Señal Vacuolar: Se utilizó la secuencia nucleotídica correspondiente a la señal vacuolar C-terminal del gen de la Quitinasa A de tabaco (Thomas y Walmsley, 2014). La señal se amplificó por overlapping PCR, utilizando los primers VS48FW y VS48RV en los que se incluyen los sitios de BsaI. El primer VS48RV incorpora además las bases para generar del extremo 5' libre complementario al extremo libre del vector pEAQ-Golden.

-Señal de retención en retículo endoplasmático: La señal de retención KDEL se incorporó en los primers reverse de las distintas proteínas.

3. Clonado de las proteínas fluorescentes y rhFGFb fusionadas a las distintas señales

3.1. Clonado de proteínas fluorescentes

Utilizando el método de *Golden Gate Assembly* se clonaron en el vector pEAQ-Golden distintas versiones de la proteína fluorescente verde (GFP) fusionada a señales de localización subcelular, a saber: GFP citoplasmática (GFP-Cit), apoplástica (GFP-Ap) y reticular (GFP-KDEL). En todos los casos, la secuencia de GFP se amplificó por PCR utilizando como molde el plásmido pUC57-GFPInkEGF que contiene una secuencia nucleotídica de GFP sin sitios de reconocimiento para BsaI. Se utilizaron primers específicos que incorporan los sitios de restricción para BsaI y las bases correspondientes para generar los extremos 5' libres adecuados.

Para el estudio de la localización vacuolar, se utilizó la proteína fluorescente roja mKOk por su estabilidad a pH ácidos (Shaner et al., 2005). Se amplificó la secuencia nucleotídica por PCR a partir del vector mKOKCtermCCDB, utilizando primers específicos con los sitios de restricción y bases necesarias para el clonado direccional por Golden Gate.

3.2. Clonado de hFGFb

Para el clonado de la versión citoplasmática de rhFGFb, se utilizó la secuencia sintética previamente diseñada para la expresión de rhFGFb en cloroplastos y *P. pastoris*. La secuencia de HIS-TEV-FGFb se amplificó por PCR a partir del vector pUC-FGFb con primers específicos FGFCTFw y FGFCTRv que incorporan los sitios de restricción NruI y XhoI en los extremos 5' y 3', respectivamente. El producto de PCR obtenido se digirió y se clonó en los sitios NruI y XhoI del vector pEAQ-HT-GFP.

Se utilizó el sistema de *Golden Gate Assembly* para el clonado de distintas versiones de la proteína recombinante rhFGFb: FGF apoplástico (FGF-Ap), FGF reticular (FGF-KDEL) y FGF vacuolar (FGF-Vac). En todos los casos, la secuencia codificante de TEV-HIS-FGFb se amplificó por PCR a partir del vector pUC-FGFb. Se utilizaron primers específicos que incorporan los sitios de restricción para BsaI y las bases correspondientes para generar los extremos 5' libres compatibles según cada fusión con las señales de localización.

3.3. Chequeo *in silico* del sitio de corte para la peptidasa de la señal

Para verificar el sitio de corte de la peptidasa de la señal en las proteínas fusionadas al péptido señal de la osmotina AP24 de tabaco, se realizó una predicción *in silico* utilizando el *software* SignalP-6.0 (Teufel et al., 2022).

En todos los casos, se encontró un sitio de corte predicho para la peptidasa de la señal. La probabilidad de los sitios de corte para GFP-Ap, mKOk-Ap y FGF-Ap fue de 0,98, indicando una alta probabilidad de corte para la peptidasa en las tres proteínas de fusión. Para las tres secuencias analizadas, luego del corte predicho se obtiene la secuencia N-terminal completa de las proteínas GFP-Ap, mKOk-Ap y FGF-Ap (figura A.5). Esto indicaría que el péptido señal de las proteínas de fusión se procesaría de forma correcta, según la predicción *in silico*.

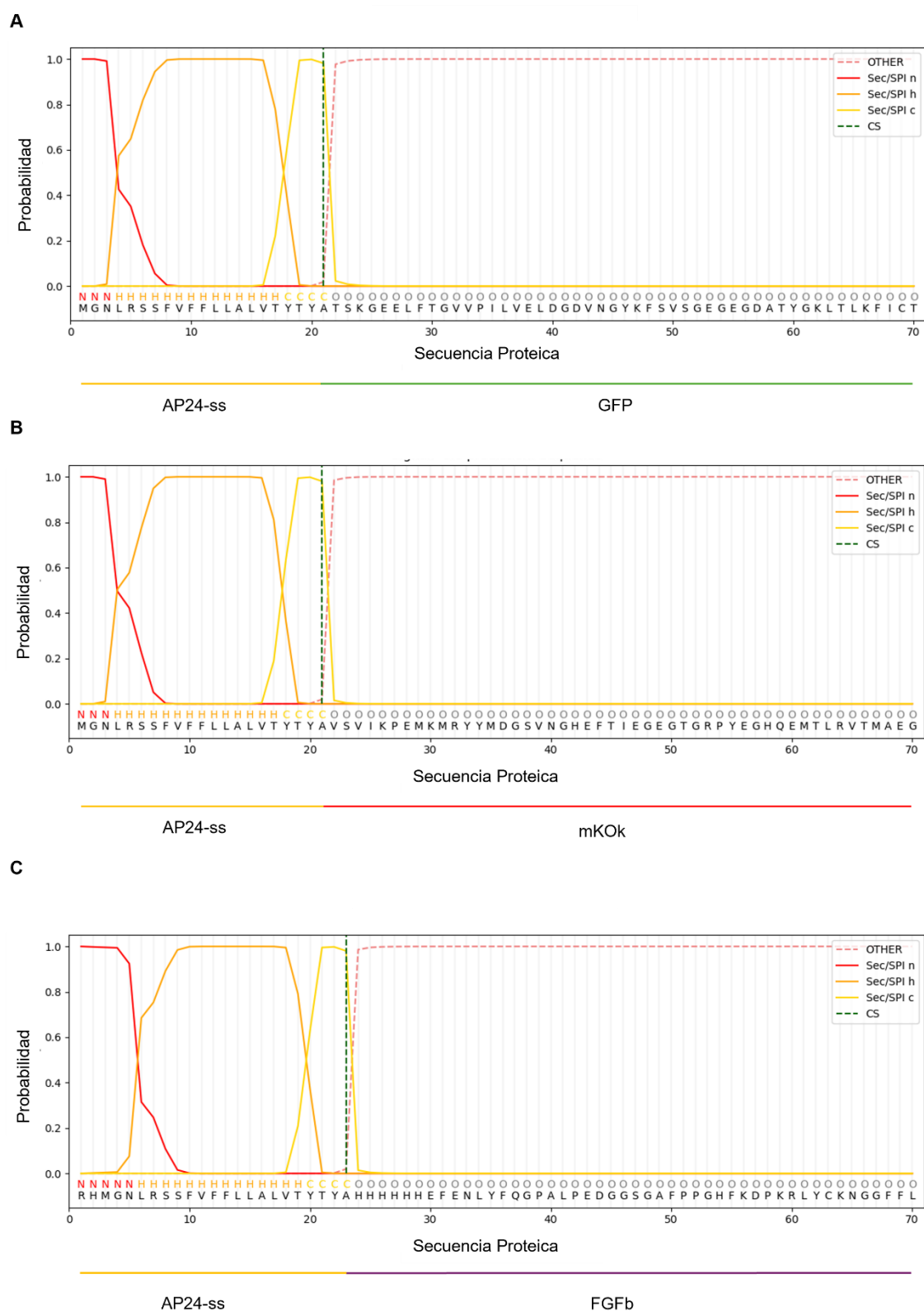


Figura A.5. Predicción del sitio de corte de la peptidasa de la señal mediante el *software* SignalP de las secuencias de las proteínas de fusión GFP-Ap (A), mKOk-Ap (B) y FGF-Ap (C). **Sec/SPI:** Péptido señal región n (N-terminal), región h (región hidrofóbica) y región c (C-terminal); **CS:** Sitio de corte. **OTHER:** secuencia no predicha como péptido señal.

Bibliografía

Ahlert, D., Ruf, S., Bock, R., 2003. Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. *PNAS* 100, 15730–15735.

Ahmad, N., Michoux, F., McCarthy, J., Nixon, P.J., 2012a. Expression of the affinity tags, glutathione-S-transferase and maltose-binding protein, in tobacco chloroplasts. *Planta* 235, 863–71.

Ahmad, N., Michoux, F., Nixon, P.J., 2012b. Investigating the production of foreign membrane proteins in tobacco chloroplasts: expression of an algal plastid terminal oxidase. *PLoS One* 7, e41722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041722>

Alfano, E.F., Lentz, E., Bellido, D., Dus Santos, M.J., Goldbaum, F.A., Wigdorovitz, A., Bravo-Almonacid, F.F., 2015. Expression of the Multimeric and Highly Immunogenic *Brucella* spp. Lumazine Synthase Fused to Bovine Rotavirus VP8d as a Scaffold for Antigen Production in Tobacco Chloroplasts. *Frontiers in Plant Science* 6, 1170.

Amroffell, M.B., Rengarajan, S., Vo, S.T., Tovar, E.S.R., LoBello, L., Dantas, G., Moon, T.S., 2023. Engineering *E. coli* strains using antibiotic-resistance-gene-free plasmids. *Cell Reports Methods* 3. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2023.100669>

An, N., Ou, J., Jiang, D., Zhang, L., Liu, J., Fu, K., Dai, Y., Yang, D., 2013. Expression of a Functional Recombinant Human Basic Fibroblast Growth Factor from Transgenic Rice Seeds. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 3556–3567. <https://doi.org/10.3390/ijms14023556>

An, Y., Wang, Y., Wang, X., Xiao, J., 2022. Development of chloroplast transformation and gene expression regulation technology in land plants. *Front. Plant Sci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1037038>

Baeshen, M.N., Al-Hejin, A.M., Bora, R.S., Ahmed, M.M.M., Ramadan, H.A.I., Saini, K.S., Baeshen, N.A., Redwan, E.M., 2015. Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. *J Microbiol Biotechnol* 25, 953–962. <https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12079>

Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A., Hoseinpoor, R., Rahbarnia, L., Aria, M., 2019. Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Mol Biotechnol* 61, 365–384. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00164-8>

Baker, N.R., 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59, 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>

Bally, J., Job, C., Belghazi, M., Job, D., 2011. Metabolic Adaptation in Transplastomic Plants Massively Accumulating Recombinant Proteins. *PLoS ONE* 6, e25289.

Bally, J., Nadai, M., Vitel, M., Rolland, A., Dumain, R., Dubald, M., 2009. Plant Physiological Adaptations to the Massive Foreign Protein Synthesis Occurring in Recombinant Chloroplasts. *Plant Physiology* 150, 1474–1481.

Bally, J., Paget, E., Droux, M., Job, C., Job, D., Dubald, M., 2008. Both the stroma and thylakoid lumen of tobacco chloroplasts are competent for the formation of disulphide bonds in recombinant proteins. *Plant Biotechnology Journal* 6, 46–61.

Benchabane, M., Goulet, C., Rivard, D., Faye, L., Gomord, V., Micheaud, D., 2008. Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnology Journal* 6, 633–648.

Beritza, K., Watts, E.C., van der Hoorn, R.A.L., 2024. Improving transient protein expression in agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana*. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.19894>

Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y.I., Abraham, N., Li, X.-Z., Zhou, T., 2021. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Front Bioeng Biotechnol* 9, 630551. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551>

Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., Rifkin, D.B., 1997. Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2. *Endocrine Reviews* 18, 26–45.

Bock, R., 2021. Engineering Chloroplasts for High-Level Constitutive or Inducible Transgene Expression. *Methods Mol Biol* 2317, 77–94. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1472-3_3

Bock, R., 2015. Engineering plastid genomes: methods, tools, and applications in basic research and biotechnology. *Annual review of plant biology* 66, 211–241.

Bock, R., 2001. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol* 312, 425–438. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4960>

Bruick, R.K., Mayfield, S.P., 1999. Light-activated translation of chloroplast mRNAs. *Trends in Plants Science* 4, 190–195.

Burnett, M.J.B., Burnett, A.C., 2020. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet* 2, 121:132.

Buyel, J.F., 2019. Plant Molecular Farming – Integration and Exploitation of Side Streams to Achieve Sustainable Biomanufacturing. *Frontiers in Plant Science* 9, 1893. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01893>

Buyel, J.F., Twyman, R.M., Fischer, R., 2015. Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. *Biotechnology Advances* 33, 902–913. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.010>

Cackett, L., Luginbuehl, L.H., Schreier, T.B., Lopez-Juez, E., Hibberd, J.M., 2022. Chloroplast development in green plant tissues: the interplay between light, hormone, and transcriptional regulation. *New Phytologist* 233, 2000–2016. <https://doi.org/10.1111/nph.17839>

Campos, P.A., Levin, L., Wirth, S., 2016. Heterologous production, characterization and dye decolorization ability of a novel thermostable laccase isoenzyme from *Trametes trogii* BAFC 463. *Process Biochemistry* 51, 895–903.

Castiglia, D., Sannino, L., Marcolongo, L., Ionata, E., Tamburino, R., De Stradis, A., Cobucci-Ponzano, B., Moracci, M., La Cara, F., Scotti, N., 2016. High-level expression of thermostable cellulolytic enzymes in tobacco transplastomic plants and their use in hydrolysis of an industrially pretreated *Arundo donax* L. biomass. *Biotechnol Biofuels* 9, 154. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0569-z>

- Chan, K.X., Phua, S.Y., Crisp, P., McQuinn, R., Pogson, B.J., 2016. Learning the Languages of the Chloroplast: Retrograde Signaling and Beyond. *Annu Rev Plant Biol* 67, 25–53. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111854>
- Chen, R., 2012. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances* 30, 1102–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013>
- Chiang, A.W.T., Li, S., Kellman, B.P., Chattopadhyay, G., Zhang, Y., Kuo, C.-C., Gutierrez, J.M., Ghazi, F., Schmeisser, H., Ménard, P., Bjørn, S.P., Voldborg, B.G., Rosenberg, A.S., Puig, M., Lewis, N.E., 2019. Combating viral contaminants in CHO cells by engineering innate immunity. *Sci Rep* 9, 8827. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45126-x>
- Chung, Y.H., Church, D., Koellhoffer, E.C., Osota, E., Shukla, S., Rybicki, E.P., Pokorski, J.K., Steinmetz, N.F., 2022. Integrating plant molecular farming and materials research for next-generation vaccines. *Nat Rev Mater* 7, 372–388. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00399-5>
- Clark, M., Maselko, M., 2020. Transgene Biocontainment Strategies for Molecular Farming. *Frontiers in Plant Science* 11, 210. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00210>
- Coates, R.J., Young, M.T., Scofield, S., 2022. Optimising expression and extraction of recombinant proteins in plants. *Frontiers in Plant Science* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1074531>
- Contreras-Gómez, A., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., Molina-Grima, E., Chisti, Y., 2014. Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnology Progress* 30, 1–18. <https://doi.org/10.1002/btpr.1842>
- Dagar, V.K., Babbal, Mohanty, S., Khasa, Y.P., 2022. Effect of N-glycosylation on secretion, stability, and biological activity of recombinant human interleukin-3 (hIL-3) in *Pichia pastoris*. *3 Biotech* 12, 221. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03293-1>
- Daniell, H., Lin, C.-S., Yu, M., Chang, W.-J., 2016. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biology* 17, 134.
- Davies, H.M., 2010. Commercialization of whole-plant systems for biomanufacturing of protein products: evolution and prospects. *Plant Biotechnology Journal* 8, 845–861.
- Day, A., Goldschmidt-Clermont, M., 2011. The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant Biotechnology Journal* 9, 540–553.
- De Neve, M., De Buck, S., De Wilde, C., Van Houdt, H., Strobbe, I., Jacobs, A., Van Montagu, null, Depicker, A., 1999. Gene silencing results in instability of antibody production in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 260, 582–592. <https://doi.org/10.1007/s004380050932>
- Ding, S.-H., Huang, L.-Y., Wang, Y.-D., Sun, H.-C., Xiang, Z.-H., 2006. High-level expression of basic fibroblast growth factor in transgenic soybean seeds and characterization of its biological activity. *Biotechnol Lett* 28, 869–875. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9018-6>
- Doğan, A., 2018. Embryonic Stem Cells in Development and Regenerative Medicine. *Adv Exp Med Biol* 1079, 1–15. https://doi.org/10.1007/5584_2018_175

- Duchêne, S., Siegenthaler, P.-A., 2000. Do glycerolipids display lateral heterogeneity in the thylakoid membrane? *Lipids* 35, 739–744. <https://doi.org/10.1007/s11745-000-0580-4>
- Eibl, C., Zou, Z., Beck, A., Kim, M., Mullet, J., Koop, H., 1999. In vivo analysis of plastid psbA, rbcL and rpl32 UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. *Plant Journal* 19, 333–45. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00543.x>
- Eidenberger, L., Kogelmann, B., Steinkellner, H., 2023. Plant-based biopharmaceutical engineering. *Nat Rev Bioeng* 1, 426–439. <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00044-6>
- Eiselleova, L., Matulka, K., Kriz, V., Kunova, M., Schmidtova, Z., Neradil, J., Tichy, B., Dvorakova, D., Pospisilova, S., Hampl, A., Dvorak, P., 2009. A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27, 1847–1857. <https://doi.org/10.1002/stem.128>
- Eissazadeh, S., Moeini, H., Dezfouli, M.G., Heidary, S., Nelofer, R., Abdullah, M.P., 2017. Production of recombinant human epidermal growth factor in *Pichia pastoris*. *Braz J Microbiol* 48, 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.017>
- Elghabi, Z., Karcher, D., Zhou, F., Ruf, S., Bock, R., 2011. Optimization of the expression of the HIV fusion inhibitor cyanovirin-N from the tobacco plastid genome. *Plant Biotechnology Journal* 9, 599–608.
- Engler, C., Kandzia, R., Marillonnet, S., 2008. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* 3, e3647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>
- Engler, C., Marillonnet, S., 2013. Combinatorial DNA Assembly Using Golden Gate Cloning, in: Polizzi, K.M., Kontoravdi, C. (Eds.), *Synthetic Biology, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 141–156. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-625-2_12
- Ergün, B.G., Berrios, J., Binay, B., Fickers, P., 2021. Recombinant protein production in *Pichia pastoris*: from transcriptionally redesigned strains to bioprocess optimization and metabolic modelling. *FEMS Yeast Res* 21, foab057. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab057>
- Felberbaum, R.S., 2015. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol J* 10, 702–714. <https://doi.org/10.1002/biot.201400438>
- Feng, Z., Li, X., Fan, B., Zhu, C., Chen, Z., 2022. Maximizing the Production of Recombinant Proteins in Plants: From Transcription to Protein Stability. *Int J Mol Sci* 23, 13516. <https://doi.org/10.3390/ijms232113516>
- Fernández-San Millán, A., Mingo-Castel, A., Miller, M., Daniell, H., 2003. A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnology Journal* 1, 71–79. <https://doi.org/10.1046/j.1467-7652.2003.00008.x>
- Fischer, R., Buyel, J.F., 2020. Molecular farming – The slope of enlightenment. *Biotechnology Advances* 40, 107519.

Friesel, R.E., Maciag, T., 1995. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB Journal* 9, 919–25.

Garcia, J., Patel, N., Basehore, S., Clyne, A.M., 2019. Fibroblast growth factor-2 binding to heparan sulfate proteoglycans varies with shear stress in flow-adapted cells. *Ann Biomed Eng* 47, 1078–1093. <https://doi.org/10.1007/s10439-019-02202-7>

Gengenbach, B.B., Müschen, C.R., Buyel, J.F., 2018. Expression and purification of human phosphatase and actin regulator 1 (PHACTR1) in plant-based systems. *Protein Expr Purif* 151, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.06.003>

Geyer, B.C., Fletcher, S.P., Griffin, T.A., Lopker, M.J., Soreq, H., Mor, T.S., 2007. Translational control of recombinant human acetylcholinesterase accumulation in plants. *BMC Biotechnology* 7, 27.

Giddings, G., 2001. Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 450–454.

Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., Riggs, A.D., 1979. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 106–110. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.106>

Goldfarb, M., 1996. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Review* 7, 311–25.

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 Biotechnology Journal* 8, 564–587.

Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A., Lommel, S.A., 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 21, 1015–1026. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-8-1015>

Ha, J.-H., Kim, H.-N., Moon, K.-B., Jeon, J.-H., Jung, D.-H., Kim, S.-J., Mason, H.S., Shin, S.-Y., Kim, H.-S., Park, K.-M., 2017. Recombinant Human Acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF) Expressed in *Nicotiana Benthamiana* Potentially Inhibits Skin Photoaging. *Planta medica* 83, 862–869.

Harding, C.M., Feldman, M.F., 2019. Glycoengineering bioconjugate vaccines, therapeutics, and diagnostics in *E. coli*. *Glycobiology* 29, 519–529. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz031>

Hiatt, A., Cafferkey, R., Bowdish, K., 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342, 76–78. <https://doi.org/10.1038/342076a0>

Hiller, M., Liu, C., Blumenthal, P.D., Gearhart, J.D., Kerr, C.L., 2011. Bone Morphogenetic Protein 4 Mediates Human Embryonic Germ Cell Derivation. *Stem Cells and Development* 20, 351–361. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0084>

Hiscox, J.D., Israelstam, G.F., 1978. A method for the extraction of chlorophyll without maceration from leaf tissue. *Canadian Journal of Botany* 57, 1332–1334.

Hood, E., Cramer, C., Medrano, G., Xu, J., 2012. 3 - Protein targeting: Strategic planning for optimizing protein products through plant biotechnology, in: Altman, A.,

Hasegawa, P.M. (Eds.), *Plant Biotechnology and Agriculture*. Academic Press, San Diego, pp. 35–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00003-1>

Hu, J., Lutz, C.S., Wilusz, J., Tian, B., 2005. Bioinformatic identification of candidate cis-regulatory elements involved in human mRNA polyadenylation. *RNA* 11, 1485–1493. <https://doi.org/10.1261/rna.2107305>

Huang, C.-J., Lin, H., Yang, X., 2012. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39, 383–399. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9>

Huang, Y., Zhen, B., Lin, Y., Cai, Y., Lin, Z., Deng, C., Zhang, Y., 2014. Expression of codon optimized human bone morphogenetic protein 4 in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 61, 175–183. <https://doi.org/10.1002/bab.1146>

Hui, Q., Jin, Z., Li, X., Liu, C., Wang, X., 2018. FGF Family: From Drug Development to Clinical Application. *Int J Mol Sci* 19, 1875. <https://doi.org/10.3390/ijms19071875>

Hunt, A.G., Li, Q.Q., 2015. Polyadenylation in Plants, 1st ed, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press.

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 Physiology* 145, 1371–1382.

Imsoonthornruksa, S., Pruksananonda, K., Parnpai, R., Rungsiwiwut, R., Ketudat-Cairns, M., 2015. Expression and Purification of Recombinant Human Basic Fibroblast Growth Factor Fusion Proteins and Their Uses in Human Stem Cell Culture. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 25, 372–80.

Jackson, C.J., Tønseth, K.A., Utheim, T.P., 2017. Cultured epidermal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther* 8, 155. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0587-1>

Janeeshma, E., Johnson, R., Amritha, M.S., Noble, L., Aswathi, K.P.R., Telesiński, A., Kalaji, H.M., Auriga, A., Puthur, J.T., 2022. Modulations in Chlorophyll a Fluorescence Based on Intensity and Spectral Variations of Light. *Int J Mol Sci* 23, 5599. <https://doi.org/10.3390/ijms23105599>

Jensen, P.E., Scharff, L.B., 2019. Engineering of plastids to optimize the production of high-value metabolites and proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 59C, 8–15.

Ji, G., Li, L., Li, Q.Q., Wu, Xiangdong, Fu, J., Chen, G., Wu, Xiaohui, 2015. PASPA: a web server for mRNA poly(A) site predictions in plants and algae. *Bioinformatics* 31, 1671–1673. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv004>

Jin, S., Daniell, H., 2015. The Engineered Chloroplast Genome Just Got Smarter. *Trends in Plants Science* 20, 622–640.

Juturu, V., Wu, J.C., 2018. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. *Chembiochem* 19, 7–21. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700460>

- Karbalaei, M., Rezaee, S.A., Farsiani, H., 2020. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol* 235, 5867–5881. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>
- Khan, A.H., Bayat, H., Rajabibazl, M., Sabri, S., Rahimpour, A., 2017. Humanizing glycosylation pathways in eukaryotic expression systems. *World J Microbiol Biotechnol* 33, 4. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2172-7>
- Knight, R.D., Freeland, S.J., Landweber, L.F., 2001. A simple model based on mutation and selection explains trends in codon and amino-acid usage and GC composition within and across genomes. *Genome Biology* 2.
- Kobayashi, K., 2016. Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J Plant Res* 129, 565–580. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0827-y>
- Kommineni, V., Markert, M., Ren, Z., Palle, S., Carrillo, B., Deng, J., Tejeda, A., Nandi, S., McDonald, K.A., Marcel, S., Holtz, B., 2019. In Vivo Glycan Engineering via the Mannosidase I Inhibitor (Kifunensine) Improves Efficacy of Rituximab Manufactured in *Nicotiana benthamiana* Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 194.
- Kopertekh, L., Schiemann, J., 2019. Enhanced foreign protein accumulation in *Nicotiana benthamiana* leaves co-infiltrated with a TMV vector and plant cell cycle regulator genes. *Transgenic research* 28, 411–417.
- Kuddus, Md.R., Rumi, F., Tsutsumi, M., Takahashi, R., Yamano, M., Kamiya, M., Kikukawa, T., Demura, M., Aizawa, T., 2016. Expression, purification and characterization of the recombinant cysteine-rich antimicrobial peptide snakin-1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 122, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.02.002>
- Kuroda, H., Maliga, P., 2002. Overexpression of the clpP 5'-untranslated region in a chimeric context causes a mutant phenotype, suggesting competition for a clpP-specific RNA maturation factor in tobacco chloroplasts. *Plant Physiol* 129, 1600–1606. <https://doi.org/10.1104/pp.004986>
- Kurotani, K., Hirakawa, H., Shirasawa, K., Tanizawa, Y., Nakamura, Y., Isobe, S., Notaguchi, M., 2023. Genome Sequence and Analysis of *Nicotiana benthamiana*, the Model Plant for Interactions between Organisms. *Plant and Cell Physiology* 64, 248–257. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac168>
- Kusnadi, A.R., Hood, E.E., Witcher, D.R., Howard, J.A., Nikolov, Z.L., 1998. Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. *Biotechnol Prog* 14, 149–155. <https://doi.org/10.1021/bp970138u>
- La Venuta, G., Wegehangel, S., Sehr, P., Müller, H.-M., Dimou, E., Steringer, J.P., Grotwinkel, M., Hentze, N., Meyer, M.P., Will, D.W., Uhrig, U., Lewis, J.D., Nickel, W., 2016. Small Molecule Inhibitors Targeting Tec Kinase Block Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2. *The Journal of Biological Chemistry* 291, 17787–17803.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., Burgyán, J., 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J* 23, 876–884. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600096>

Lal, M., Bhardwaj, E., Chahar, N., Dangwal, M., Das, S., 2020. (Trans)Gene Flow: Mechanisms, Biosafety Concerns and Mitigation for Containment, in: Tandon, R., Shivanna, K.R., Koul, M. (Eds.), *Reproductive Ecology of Flowering Plants: Patterns and Processes*. Springer, Singapore, pp. 335–394. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4210-7_15

Lalonde, M.-E., Durocher, Y., 2017. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J Biotechnol* 251, 128–140. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.028>

Lee, J., Lee, S.-K., Park, J.-S., Lee, K.-R., 2023. Plant-made pharmaceuticals: exploring studies for the production of recombinant protein in plants and assessing challenges ahead. *Plant Biotechnol Rep* 17, 53–65. <https://doi.org/10.1007/s11816-023-00821-0>

Lee, J.-H., Um, S., Jang, J.-H., Seo, B.M., 2012. Effects of VEGF and FGF-2 on proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Cell Tissue Research* 348, 475–84. <https://doi.org/doi:10.1007/s00441-012-1392-x>.

Leelavathi, S., Reddy, V.S., 2003. Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. *Molecular Breeding* 11, 49–58.

Lentz, E.M., Garaicoeche, L., Alfano, E.F., Parreño, V., Wigdorovitz, A., Bravo-Almonacid, F.F., 2012. Translational fusion and redirection to thylakoid lumen as strategies to improve the accumulation of a camelid antibody fragment in transplastomic tobacco. *Planta* 236, 703–714.

Lentz, E.M., Segretin, M.E., Morgenfeld, M.M., Wirth, S.A., Dus Santos, M.J., Mozgovoij, M.V., Wigdorovitz, A., Bravo-Almonacid, F.F., 2010. High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants. *Planta* 231, 387–95. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1058-4>.

Leong, T.Y., Anderson, J.M., 1984. Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. II. Regulation of electron transport capacities, electron carriers, coupling factor (CF1) activity and rates of photosynthesis. *Photosynth Res* 5, 117–128. <https://doi.org/10.1007/BF00028525>

Levenstein, M.E., Ludwig, T.E., Xu, R.-H., Llanas, R.A., VanDenHeuvel-Kramer, K., Manning, D., Thomson, J.A., 2006. Basic Fibroblast Growth Factor Support of Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells* 24, 568–574. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0247>

Li, H., Ali, Z., Liu, X., Jiang, L., Tang, Y., Dai, J., 2019. Expression of recombinant tachyplesin I in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 157, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.01.012>

Lichty, J.J., Malecki, J.L., Agnew, H.D., Michelson-Horowitz, D.J., Tan, S., 2005. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification* 41, 98–105.

Lin-Cereghino, G.P., Stark, C.M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, H., Agari, K., Moua, P., Low, L.K., Tran, N., Huang, A.D., Nattestad, M., Oshiro, K.T., Chang, J.W., Chavan, A., Tsai, J.W., Lin-Cereghino, J., 2013. The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene* 519, 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.01.062>

Liu, Y., Wu, C., Wang, J., Mo, W., Yu, M., 2013. Codon optimization, expression, purification, and functional characterization of recombinant human IL-25 in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 10349–10358.

Loke, J., Stahlberg, E.A., Strenski, D.G., Haas, B.J., Wood, P.C., Li, Q.Q., 2005. Compilation of mRNA Polyadenylation Signals in *Arabidopsis* Revealed a New Signal Element and Potential Secondary Structures. *Plant Physiology* 138, 1457–1468.

Lolicato, F., Steringer, J.P., Saleppico, R., Beyer, D., Fernandez-Sobaberas, J., Unger, S., Klein, S., Riegerová, P., Wegehangel, S., Müller, H.M., Schmitt, X.J., Kaptan, S., Freund, C., Hof, M., Šachl, R., Chlanda, P., Vattulainen, I., Nickel, W., 2023. Disulfide bridge-dependent dimerization triggers FGF2 membrane translocation into the extracellular space. *eLife* 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.88579.2>

Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D., Kovar, K., 2015. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances* 33, 1177–1193.

Lössl, A., Eibl, C., Harloff, H.-J., Jung, C., Koop, H.-U., 2003. Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Rep* 21, 891–899. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0610-0>

Lu, Y., Rijzaani, H., Karcher, D., Ruf, S., Bock, R., 2013. Efficient metabolic pathway engineering in transgenic tobacco and tomato plastids with synthetic multigene operons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E623-632. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216898110>

Macauyag, E.A., Kajiura, H., Ohashi, T., Misaki, R., Fujiyama, K., 2022. High-level transient production of a protease-resistant mutant form of human basic fibroblast growth factor in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Plant Biotechnol (Tokyo)* 39, 291–301. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.22.0628a>

Maliga, P., 2004. Plastid Transformation in higher plants. *Annual review of plant biology* 55, 289–313. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141633>

Maliga, P., Bock, R., 2011. Plastid Biotechnology: Food, Fuel, and Medicine for the 21st Century. *Plant Physiology* 155, 1501–1510.

Mamat, U., Wilke, K., Bramhill, D., Schromm, A.B., Lindner, B., Kohl, T.A., Corchero, J.L., Villaverde, A., Schaffer, L., Head, S.R., Souvignier, C., Meredith, T.C., Woodard, R.W., 2015. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microb Cell Fact* 14, 57. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0241-5>

Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Gleba, Y., 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral vectors for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology* 23.

Masuda, A., Xu, J., Minamihata, K., Kagawa, G., Hamada, Y., Morifuji, Y., Yano, T., Hino, M., Morokuma, D., Karasaki, N., Mon, H., Kamiya, N., Kusakabe, T., Lee, J.M., 2018. Production of a biologically active human basic fibroblast growth factor using silkworm-baculovirus expression vector system. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 21, 716–720. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.05.002>

Messant, M., Krieger-Liszkay, A., Shimakawa, G., 2021. Dynamic Changes in Protein-Membrane Association for Regulating Photosynthetic Electron Transport. *Cells* 10, 1216. <https://doi.org/10.3390/cells10051216>

Mohammedi, M., Olsen, S.K., Ibrahimi, O.A., 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Reviews* 16, 107–37.

Morgenfeld, M.M., Vater, C.F., Alfano, E.F., Boccardo, N.A., Bravo-Almonacid, F.F., 2020. Translocation from the chloroplast stroma into the thylakoid lumen allows expression of recombinant epidermal growth factor in transplastomic tobacco plants. *Transgenic research*.

Mossahebi-Mohammadi, M., Quan, M., Zhang, J.-S., Li, X., 2020. FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00079>

Mu, X., Kong, N., Chen, W., Zhang, T., Shen, M., Yan, W., 2008. High level expression, purification, and characterization of recombinant human basic fibroblast growth factor in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 59, 282–288.

Müller, A.E., 2010. Gene Silencing in Plants: Transgenes as Targets and Effectors, in: Kempken, F., Jung, C. (Eds.), *Genetic Modification of Plants: Agriculture, Horticulture and Forestry*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 79–101. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02391-0_5

Nausch, H., Mikschofsky, H., Koslowski, R., Meyer, U., Broer, I., Huckauf, J., 2012. High-Level Transient Expression of ER-Targeted Human Interleukin 6 in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE* 7, e48938.

Niederhaus, C., Garrido, M., Insani, M., Campos, E., Wirth, S., 2018. Heterologous production and characterization of a thermostable GH10 family endo-xylanase from *Pycnoporus sanguineus* BAFC 2126. *Process Biochemistry* 67, 92–98.

Niederhuth, C.E., Schmitz, R.J., 2017. Putting DNA methylation in context: from genomes to gene expression in plants. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1860, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.08.009>

Nimir, N.E.A., Guisheng, Z., Nimir, N.E.A., Guisheng, Z., 2018. Photosynthesis and Carbon Metabolism, in: *Photosynthesis - From Its Evolution to Future Improvements in Photosynthetic Efficiency Using Nanomaterials*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78031>

Nishikawa, S.-I., Jakt, L.M., Era, T., 2007. Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 502–507. <https://doi.org/10.1038/nrm2189>

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267, 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>

Ocampo, C.G., Lareu, J.F., Marin Viegas, V.S., Mangano, S., Loos, A., Steinkellner, H., Petrucci, S., 2016. Vacuolar targeting of recombinant antibodies in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnology Journal* 1–11.

Oliveira, C., Domingues, L., 2018. Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 81–92. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8623-8>

Ortega, S., Ittman, M., Tsang, S.H., Ehrlich, M., Basilico, C., 1998. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 5672–5677.

Parashar, D., Satyanarayana, T., 2017. Production of Chimeric Acidic α -Amylase by the Recombinant *Pichia pastoris* and Its Applications. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00493>

Park, S., Kim, J.Y., Ryu, K.-H., Kim, A.-Y., Kim, J., Ko, Y.-J., Lee, E.G., 2021. Production of a Foot-and-Mouth Disease Vaccine Antigen Using Suspension-Adapted BHK-21 Cells in a Bioreactor. *Vaccines* 9, 505.

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

Peyret, H., Brown, J.K.M., Lomonossoff, G.P., 2019. Improving plant transient expression through the rational design of synthetic 5' and 3' untranslated regions. *Plant Methods* 15, 108.

Peyret, H., Lomonossoff, G.P., 2013. The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants. *Plant Molecular Biology* 83, 51–58.

Pombo, M.A., Rosli, H.G., Fernandez-Pozo, N., Bombarely, A., 2020. *Nicotiana benthamiana*, A Popular Model for Genome Evolution and Plant–Pathogen Interactions, in: Ivanov, N.V., Sierro, N., Peitsch, M.C. (Eds.), *The Tobacco Plant Genome*. Springer International Publishing, Cham, pp. 231–247. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29493-9_14

Poudel, S.B., Min, C., Lee, J.-H., Shin, Y.-J., Kwon, T., Jeon, Y., Lee, J., 2019. Local supplementation with plant-derived recombinant human FGF2 protein enhances bone formation in critical-sized calvarial defects. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 37, 900–912.

Puetz, J., Wurm, F.M., 2019. Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. *Processes* 7, 476. <https://doi.org/10.3390/pr7080476>

Reddy, A.S.N., Huang, J., Syed, N.H., Ben-Hur, A., Dong, S., Gu, L., 2020. Decoding co-/post-transcriptional complexities of plant transcriptomes and epitranscriptome using next-generation sequencing technologies. *Biochem Soc Trans* 48, 2399–2414. <https://doi.org/10.1042/BST20190492>

Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., Bongso, A., 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18, 399–404. <https://doi.org/10.1038/74447>

Rigano, M.M., Manna, C., Giulini, A., Pedrazzini, E., Capobianchi, M., Castillett, C., Di Caro, A., Ippolito, G., Beggio, P., De Giuli Morghen, C., Monti, L., Vitale, A., Cardi, T.,

2009. Transgenic chloroplasts are efficient sites for high-yield production of the vaccinia virus envelope protein A27L in plant cells†. *Plant Biotechnology Journal* 7, 577–591. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00425.x>

Rogalski, M., Schöttler, M.A., Thiele, W., Schulze, W.X., Bock, R., 2008. Rpl33, a Nonessential Plastid-Encoded Ribosomal Protein in Tobacco, Is Required under Cold Stress Conditions. *The Plant Cell* 20, 2221–2237.

Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5.

Rosano, G.L., Morales, E.S., Ceccarelli, E.A., 2019. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Sci* 28, 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>

Rozov, S.M., Zagorskaya, A.A., Konstantinov, Y.M., Deineko, E.V., 2023. Three Parts of the Plant Genome: On the Way to Success in the Production of Recombinant Proteins. *Plants* 12, 38. <https://doi.org/10.3390/plants12010038>

Ruiz, O.N., Daniell, H., 2005. Engineering cytoplasmic male sterility via the chloroplast genome by expression of {beta}-ketothiolase. *Plant Physiol* 138, 1232–1246. <https://doi.org/10.1104/pp.104.057729>

Sainsbury, F., 2020. Innovation in plant-based transient protein expression for infectious disease prevention and preparedness. *Current Opinion in Biotechnology* 61, 110–115.

Sainsbury, F., Lomonossoff, G.P., 2008. Extremely High-Level and Rapid Transient Protein Production in Plants without the Use of Viral Replication. *Plant Physiol* 148, 1212–1218. <https://doi.org/10.1104/pp.108.126284>

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 Biotechnology Journal* 7, 682–693.

Sanchez-Garcia, L., Martín, L., Manges, R., Ferrer-Miralles, N., Vázquez, E., Villaverde, A., 2016. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microbial cell factories* 15. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0437-3>

Sandomenico, A., Sivaccumar, J.P., Ruvo, M., 2020. Evolution of *Escherichia coli* Expression System in Producing Antibody Recombinant Fragments. *Int J Mol Sci* 21, 6324. <https://doi.org/10.3390/ijms21176324>

Schillberg, S., Raven, N., Spiegel, H., Rasche, S., Buntru, M., 2019. Critical Analysis of the Commercial Potential of Plants for the Production of Recombinant Proteins. *Frontiers in Plant Science* 10, 720. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00720>

Schoberer, J., Strasser, R., 2017. Plant glyco-biotechnology. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.

Schuster, L.A., Reisch, C.R., 2022. Plasmids for Controlled and Tunable High-Level Expression in *E. coli*. *Appl Environ Microbiol* 88, e0093922. <https://doi.org/10.1128/aem.00939-22>

Schütz, A., Bernhard, F., Berrow, N., Buyel, J.F., Ferreira-da-Silva, F., Hastraete, J., van den Heuvel, J., Hoffmann, J.-E., de Marco, A., Peleg, Y., Suppmann, S., Unger, T., Vanhoucke, M., Witt, S., Remans, K., 2023. A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production. *STAR Protoc* 4, 102572. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102572>

Scotti, N., Bellucci, M., Cardi, T., 2013. The Chloroplasts as Platform for Recombinant Proteins Production, in: Duchêne, A.-M. (Ed.), *Translation in Mitochondria and Other Organelles*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 225–262. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39426-3_10

Scotti, N., Cardi, T., 2014. Transgene-induced pleiotropic effects in transplastomic plants. *Biotechnology Letters* 36. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1356-6>

Segretin, M.E., Lentz, E.M., Wirth, S.A., Morgenfeld, M.M., Bravo-Almonacid, F.F., 2012. Transformation of *Solanum tuberosum* plastids allows high expression levels of β -glucuronidase both in leaves and microtubers developed in vitro. *Planta* 235, 807–818. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1541-6>

Shaner, N.C., Steinbach, P.A., Tsien, R.Y., 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2, 905–909.

Shanmugaraj, B., I Bulaon, C.J., Phoolcharoen, W., 2020. Plant Molecular Farming: A Viable Platform for Recombinant Biopharmaceutical Production. *Plants (Basel)* 9, 842. <https://doi.org/10.3390/plants9070842>

Sharp, P.M., Li, W.-H., 1987. The codon adaptation index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research* 15, 1281–1295.

Sheludko, Y.V., Sindarovska, Y.R., Gerasymenko, I.M., Bannikova, M.A., Kuchuk, N.V., 2007. Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Biotechnology and Bioengineering* 96, 608–14.

Shin, S.K., Hyeon, J.E., Kim, Y.I., Kang, D.H., Kim, S.W., Park, C., Han, S.O., 2015. Enhanced hydrolysis of lignocellulosic biomass: Bi-functional enzyme complexes expressed in *Pichia pastoris* improve bioethanol production from *Miscanthus sinensis*. *Biotechnology Journal* 10, 1912–1919. <https://doi.org/10.1002/biot.201500081>

Shrivastava, A., Pal, M., Sharma, R.K., 2023. *Pichia* as yeast cell factory for production of industrially important bio-products: Current trends, challenges, and future prospects. *Journal of Bioresources and Bioproducts* 8, 108–124. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2023.01.007>

Sibbald, S.J., Archibald, J.M., 2020. Genomic Insights into Plastid Evolution. *Genome Biol Evol* 12, 978–990. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa096>

Sijmons, P.C., Dekker, B.M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T.C., van den Elzen, P.J., Hoekema, A., 1990. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology (N Y)* 8, 217–221. <https://doi.org/10.1038/nbt0390-217>

Sinclair, G., Choy, F.Y.M., 2002. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 26, 96–105.

Song, Y., Ding, J., Jin, R., Jung, J., Li, S., Yang, J., Wang, A., Li, Z., 2016. Expression and purification of FGF21 in *Pichia pastoris* and its effect on fibroblast-cell migration. *Molecular Medicine Reports* 13, 3619–3626.

Soni, A.P., Lee, J., Shin, K., Koiwa, H., Hwang, I., 2022. Production of Recombinant Active Human TGF β 1 in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science* 13.

Svitashev, S.K., Pawlowski, W.P., Makarevitch, I., Plank, D.W., Somers, D.A., 2002. Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *The Plant Journal* 32, 433–445. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01433.x>

Temmerman, K., Ebert, A.D., Müller, H.-M., Sinning, I., Tews, I., Nickel, W., 2008. A Direct Role for Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2. *Traffic* 9, 1204–1217.

Thak, E.J., Kim, J., Lee, D.-J., Kim, J.Y., Kang, H.A., 2018. Structural analysis of N-/O-glycans assembled on proteins in yeasts. *J Microbiol.* 56, 11–23. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7468-x>

Thomas, D.R., Walmsley, A.M., 2014. Improved expression of recombinant plant-made hEGF. *Plant Cell Reports* 33, 1801–1814.

Tschofen, M., Knopp, D., Hood, E., Stöger, E., 2016. Plant Molecular Farming: Much More than Medicines. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 9, 271–294. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071015-041706>

Tsuda, M., Nonaka, K., 2024. Recent progress on heterologous protein production in methylotrophic yeast systems. *World J Microbiol Biotechnol* 40, 200. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04008-9>

Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Fischer, R., 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *TRENDS in biotechnology* 21, 570–578.

Valdez-Ortiz, A., Rascón-Cruz, Q., Medina-Godoy, S., Sinagawa-García, S.R., Valverde-González, M.E., Paredes-López, O., 2005. One-step purification and structural characterization of a recombinant His-tag 11S globulin expressed in transgenic tobacco. *Journal of Biotechnology* 115, 413–23.

Venkataraman, S., Khan, I., Habibi, P., Le, M., Lippert, R., Hefferon, K., 2023. Recent advances in expression and purification strategies for plant made vaccines. *Front Plant Sci* 14, 1273958. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1273958>

Venkatesan, M., Semper, C., Skrivergaard, S., Di Leo, R., Mesa, N., Rasmussen, M.K., Young, J.F., Therkildsen, M., Stogios, P.J., Savchenko, A., 2022. Recombinant production of growth factors for application in cell culture. *iScience* 25, 105054. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105054>

Vogl, T., Glieder, A., 2013. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *N Biotechnol* 30, 385–404. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.010>

Volkov, R.A., Komarova, N.Y., Zentgraf, U., Hemleben, V., 2006. Molecular cell biology: Epigenetic gene silencing in plants, in: Esser, K., Lüttge, U., Beyschlag, W., Murata, J. (Eds.), *Progress in Botany*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 101–133. https://doi.org/10.1007/3-540-27998-9_5

Waheed, M.T., Thönes, N., Müller, M., Hassan, S.W., Gottschamel, J., Lössl, E., Kaul, H.-P., Lössl, A.G., 2011. Plastid expression of a double-pentameric vaccine candidate containing human papillomavirus-16 L1 antigenfused with LTB as adjuvant: transplastomic plantsshow pleiotropic phenotypes. *Plant Biotechnology Journal* 9, 651–660.

Wang, Q., Stuczynski, M., Gao, Y., Betenbaugh, M.J., 2015. Strategies for Engineering Protein N-Glycosylation Pathways in Mammalian Cells. *Methods Mol Biol* 1321, 287–305. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2760-9_20

Wang, X., Chung, K.P., Lin, W., Jiang, L., 2018. Protein secretion in plants: conventional and unconventional pathways and new techniques. *Journal of Experimental Botany* 69, 21–37. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx262>

Wang, Y.-P., Wei, Z.-Y., Zhong, X.-F., Lin, C.-J., Cai, Y.-H., Ma, J., Zhang, Y.-Y., Liu, Y.-Z., Xing, S.-C., 2016. Stable Expression of Basic Fibroblast Growth Factor in Chloroplasts of Tobacco. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 19. <https://doi.org/10.3390/ijms17010019>

Wilbers, R.H.P., Westerhof, L.B., van Raaij, D.R., van Adrichem, M., Prakasa, A.D., Lozano-Torres, J.L., Bakker, J., Smant, G., Schots, A., 2016. Co-expression of the protease furin in *Nicotiana benthamiana* leads to efficient processing of latent transforming growth factor- β 1 into a biologically active protein. *Plant Biotechnology Journal* 14, 1695–1704.

Wilding, K.M., Hunt, J.P., Wilkerson, J.W., Funk, P.J., Swensen, R.L., Carver, W.C., Christian, M.L., Bundy, B.C., 2019. Endotoxin-Free *E. coli*-Based Cell-Free Protein Synthesis: Pre-Expression Endotoxin Removal Approaches for on-Demand Cancer Therapeutic Production. *Biotechnology Journal* 14, 1800271. <https://doi.org/10.1002/biot.201800271>

Wirth, S., Segretin, M.E., Mentaberry, A., Bravo-Almonacid, F., 2006. Accumulation of hEGF and hEGF–fusion proteins in chloroplast-transformed tobacco plants is higher in the dark than in the light. *Journal of Biotechnology* 125, 159–172. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.012>

Xu, J., Dolan, M.C., Medrano, G., Cramer, C.L., Weathers, P.J., 2012. Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology Advances* 30, 1171–1184.

Xu, W.-J., Lin, Y., Mi, C.-L., Pang, J.-Y., Wang, T.-Y., 2023. Progress in fed-batch culture for recombinant protein production in CHO cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 107, 1063–1075. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12342-x>

Xu, Y., Zhao, Z., Geng, Z., Zhou, H., Yang, C., Wang, Y., Kuerban, B., Xiao, Y., Luo, G., 2023. Enhancement of recombinant human interleukin-22 production by fusing with human serum albumin and supplementing N-acetylcysteine in *Pichia Pastoris*. *Protein Expression and Purification* 212, 106360. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2023.106360>

Yang, J., Qiang, W., Ren, S., Yi, S., Li, J., Guan, L., Du, L., Guo, Y., Hu, H., Li, H., Li, X., 2018. High-efficiency production of bioactive oleosin-basic fibroblast growth factor in A.

thaliana and evaluation of wound healing. *Gene* 639, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.09.064>

Yang, M., Teymorian, S., Olivares, P., Murthy, P.P.N., 2015. Extracellular expression of alkaline phytase in *Pichia pastoris*: Influence of signal peptides, promoters and growth medium. *Biotechnology Reports* 6, 112–118.

Yang, Z., Zhang, Z., 2018. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances* 36, 182–195.

Zhang, S., Huang, Y., Zhu, J., Shan, L., Gao, J., Zhang, Y., Yu, N., Yang, L., Huang, J., 2018. Expression of hNeuritin protein in a baculovirus expression system and the analysis of its activity. *Gene* 647, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.026>