

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

***Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi como sistema heterólogo para la producción de lactógeno placentario humano (hPL)**

Iratxe Urreta Gómez
2011



Ésta obra está bajo una [Licencia Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a la Fundación Cándido Iturriaga y María de Dañobeitia la concesión de la beca predoctoral que me ha permitido realizar gran parte de este trabajo.

En segundo lugar, agradecer a Neiker-Tecnalia el poner a mi disposición las instalaciones y equipamientos que han hecho posible la consecución de la parte experimental de esta tesis doctoral.

A la Dra. Castañón de la Torre, directora de este trabajo, tengo que agradecerle el haberme iniciado en el mundo de la investigación, cuando yo tenía mis dudas. Gracias por todo lo que me has enseñado y por tu apoyo a lo largo de todos estos años trabajando juntas.

Gracias al Dr. Adolfo García-Ocaña y a la Dra. Rupangi Vasavada de la Universidad de Pittsburgh por acogerme tan amablemente en su laboratorio y enseñarme a cultivar células animales. Gracias también a José Manuel y Taylor por el apoyo con los experimentos, y a Inés y Julia por su simpatía.

Gracias a la Dra. Paloma Moncaleán y al Dr. Pablo Goikoetxea por sus sugerencias y por estar ahí cuando surgían dudas, y a Sonia Suárez por traernos algo nuevo al laboratorio.

Mi mayor agradecimiento es, sin ninguna duda, para mis compañeras y compañeros del laboratorio de Biotecnología de Neiker.

Esker mila Ziortza eta Judithentzat nere material begetala mantentzeagatik nik ezin izan dudanean, eta hartu ditugun kaña, biosolan eta pintxoengatik. Eskerrak Itziarri eta bere jenio biziari, estadistikarekin lagundu izanagatik eta elkarrekin egin ditugun barrengatik. Beste horrenbeste Argiñerentzat eta Inesentzat, pisukide izandako garaietan bizi izan ditugun pasarte guztiengatik. Milesker Ernesto, hain tipo jatorra izateagatik (zorte on Mungian), eta Amaiari bere umore onagatik. Nuri, esker mila beti egon zarelako laguntzeko prest, baita Ainarari, elkarrekin denbora gutxi egon garen arren. Eskerrak Ana Herrani bere pazientzia eta laguntzagatik kalitate kontuekin. Eskerrak be Rakeli (gure Reixel), Leireri, Isiri, Monicari eta Ana Aragonesi beren animo eta lankidetzagatik.

Javi, gracias por tu inquebrantable optimismo (nunca he visto nada igual) y por intentar siempre levantar el ánimo a la gente. No me quiero olvidar de Cristina (mi Cris), todavía se te hecha en falta!!!! Gracias por tus sugerencias, tu buen humor y tu amistad. Gracias a Maite, por preocuparse tanto de la gente del labo, y tener siempre a punto los

matraces, puntas, etc., tu trabajo es inestimable! Gracias a Elena y a Bego por ayudarme con los medios, potitos, el autoclave...

Bukatzeko, bereziki eskertu nahi diot Elena Bagazgoitari momentu txarretan beti nire ondoan egon izana, laguntzen eta animoak ematen. Mila esker Elena, lan hau zurea ere bada!!

Eta nola ez, eskerrak Iñigori, beti hor dagoelako, momentu onetan eta txarretan, eta beti laguntzeko prest.

Eskerrak nere familia eta lagunei izan duzuen pazientziagatik; bukatu dut azkenean tesia!!

ABREVIATURAS

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2x35S CaMV: Promotor doble 35S del virus del mosaico de la coliflor

35S CaMV: Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor

5'UTR: Regiones no traducidas 5'

aadA: Gen *aminoglicósido-3-adeniltransferasa*

AIA: Ácido indol acético

ANA: Ácido naftalen-acético

BAP: Benzilaminopurina

bla: Gen β *lactamasa*.

BrdU: Bromodeoxiuridina

BSA: Albúmina sérica bovina

BY-2: Línea celular Bright Yellow 2 de tabaco

cDNA: DNA complementario

CHO: Células de ovario de hámster chino

CHS: Gen *calcona sintasa* de *Petroselinum crispum*

DEPC: Dietilpirocarbonato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleótidos

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EFSA: Agencia Europea de Seguridad Alimentaria

ELISA: Enzimoimmunoensayo

GMP: Buenas prácticas de manufacturación

GLP: Buenas prácticas de laboratorio

hCS: Somatomotropina coriónica humana

HEPES: Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanosulfónico

HGF: Factor de crecimiento hepático

hGH-N: Hormona del crecimiento humana

hGH-V: Variante placentaria de la hormona del crecimiento humana

hPL: Lactógeno placentario humano

hPLr: hPL recombinante

hPRL: Prolactina humana

ABREVIATURAS

IGF-1: Factor similar a la insulina

INS-1: Línea celular de células β pancreáticas derivadas de un insulinoma de rata

IP: Propiedad intelectual

JAK: Janus kinasa

kDa: Kilodalton

MIC: Medio de inducción de callos

MOPS: Ácido 4-morfolino-propanosulfónico

mRNA: RNA mensajero

MS: Medio Murashige y Skoog

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica

NIH: Instituto Nacional de la Salud de los EE.UU

***nptII*:** Gen *neomicina fosfotransferasa II*

OGM: Organismo genéticamente modificado

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

PBS: Tampón fosfato salino

PBST: Tampón fosfato salino suplementado con Tween 20

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PF: Peso fresco

PMSF: Fenil-metil-sulfonilfluoruro

PS: Peso seco

pSTAT5: Forma fosforilada de la molécula STAT5

PTHrP: Proteína relacionada con la hormona paratiroidea

PTS: Proteína total soluble

PTSC: PBST suplementado con suero de caballo

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

RE: Retículo endoplasmático

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: Revoluciones por minuto

rRNA: RNA ribosómico

RT-PCR: Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa

SAR/MAR: Regiones de unión a andamios nucleares/ regiones de unión a matrices nucleares

SDS: Dodecil-sulfato sódico

STAT: Transductores de señal y activadores de la transcripción

ABREVIATURAS

T-DNA: DNA transferente

TMV: Virus del mosaico del tabaco

Tris: Tris hidroximetil aminometano

wt: Wild type (silvestre)

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. El lactógeno placentario humano (hPL)	1
1.2. El lactógeno y el tratamiento de la diabetes	3
1.3. Sistemas heterólogos para la producción de proteínas biofarmacéuticas	5
1.4. Sistemas heterólogos vegetales	6
1.5. Elementos determinantes para la producción de proteínas en sistemas heterólogos vegetales	11
1.6. Aspectos legales del uso de las plantas como biofactorías de producción	16
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIALES Y METODOS	21
3.1. Materiales	21
3.1.1. Material vegetal	21
3.1.2. Microorganismos	21
3.1.3. Vectores	22
3.1.4. Oligonucleótidos	22
3.1.5. Medios de cultivo y soluciones	24
3.1.6. Reactivos	24
3.2. Métodos	25
3.2.1. Técnicas básicas de Biología Molecular	25
3.2.1.1. Transformación de bacterias y selección de transformantes	25
3.2.1.2. Extracción de ácidos nucleicos	26
3.2.1.3. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR	26
3.2.1.4. Secuenciación	27
3.2.1.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	27
3.2.1.6. Electroforesis de RNA en geles de agarosa con formaldehído	27
3.2.1.7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE)	28
3.2.2. Aislamiento y clonación de la secuencia codificante del gen <i>hPL</i>	28
3.2.3. Construcción de los vectores de expresión vegetales	29
3.2.4. Transformación genética y regeneración de plantas de tabaco	29
3.2.5. Amplificación mediante PCR de los genes <i>hPL</i> y <i>nptII</i>	31
3.2.6. Cuantificación de los niveles de transcripción del gen <i>hPL</i>	31
3.2.7. Extracción y cuantificación de la proteína <i>hPL</i> recombinante	32

INDICE

3.2.7.1. Western blot	32
3.2.7.2. Enzimoinmunoensayo	33
3.2.8. Purificación de la proteína hPL recombinante	34
3.2.9. Determinación de la actividad biológica de la proteína hPL recombinante	34
3.2.9.1. Obtención y mantenimiento de cultivos celulares	35
3.2.9.2. Análisis de la activación de la ruta celular JAK2/STAT5	35
3.2.9.3. Ensayos de proliferación celular en la línea INS-1	36
3.2.9.4. Ensayos de proliferación celular en islotes humanos	36
3.2.10. Estabilidad de la proteína hPL recombinante a lo largo del ciclo vital del tabaco	37
3.2.11. Análisis de la transmisión del transgén <i>hPL</i> a la progenie	38
3.2.12. Inducción de callos de tabaco y su análisis morfológico	38
3.2.13. Establecimiento y caracterización de suspensiones celulares	39
3.2.14. Tratamiento estadístico	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Clonación de la secuencia codificante del gen <i>hPL</i>	41
4.2. Construcción de los vectores de expresión pNEKhPL1 y pNEKhPL2	42
4.3. Transformación genética y regeneración de plantas transgénicas	43
4.4. Detección de los genes <i>hPL₃</i> y <i>nptII</i> en el genoma de las plantas regeneradas	45
4.5. Análisis de los niveles de transcripción del gen <i>hPL₃</i> en plantas transgénicas	46
4.6. Análisis de la producción de la proteína hPL recombinante en plantas transgénicas	47
4.7. Purificación de la proteína hPL recombinante	49
4.8. Análisis de la actividad biológica de la proteína hPL recombinante	52
4.8.1. Ensayos de activación de la ruta señalizadora JAK2/STAT5	52
4.8.2. Ensayos de Proliferación celular	54
4.9. Estabilidad de la proteína hPL recombinante a lo largo del ciclo vital del tabaco	57
4.10. Transmisión del carácter transgénico y producción de la proteína hPL recombinante en plantas de la progenie	59
4.11. Inducción de callos a partir de tejido foliar de plantas transgénicas	62
4.11.1. Análisis de los niveles de transcripción del gen <i>hPL₃</i> en callos transgénicos	64
4.11.2. Análisis de la producción de la proteína hPL recombinante en callos transgénicos	65
4.12. Establecimiento y caracterización de suspensiones celulares	68

INDICE

4.12.1. Evolución de la biomasa de las suspensiones celulares	70
4.12.2. Evolución de la cantidad de proteína total soluble (PTS) de las suspensiones celulares	71
4.12.3. Detección y cuantificación de la proteína hPL recombinante producida en suspensiones celulares transgénicas	73
5. DISCUSION	77
6. CONCLUSIONES	107
7. ANEXOS	109
7.1. Anexo I	109
7.2. Anexo II	109
7.3. Anexo III	110
8. BIBLIOGRAFIA	111

1.1. El lactógeno placentario humano (hPL)

El lactógeno placentario humano, también llamado somatomotropina coriónica (hPL o hCS) es una hormona polipeptídica de cadena sencilla que es secretada por la placenta durante el embarazo. Esta hormona de 22 kDa de peso molecular, está compuesta por 191 aminoácidos que forman la proteína madura (Barrera-Saldaña *et al.*, 1982). El lactógeno se sintetiza como una preproteína de 217 aminoácidos, 26 de los cuales forman el péptido señal. Posee dos puentes disulfuro y no presenta residuos glicosilados (Walker *et al.*, 1991).

El hPL forma parte de una familia multigénica de hormonas con actividades relacionadas, entre las que se incluyen la hormona del crecimiento humana (hGH) y la prolactina humana (hPRL) (Selvanayagam *et al.*, 1984). La similitud en la secuencia de aminoácidos entre el hPL y la hGH es del 87%, mientras que con la hPRL es del 35%, lo que ha llevado a proponer que todas ellas derivan de un único precursor. Este grupo de hormonas se habría originado a partir de un péptido primitivo más corto y mediante eventos de duplicación sucesivos ocurridos en tándem (Niall *et al.*, 1971).

El cluster *hPL/hGH* localizado en el brazo q22-24 del cromosoma 17 (Barrera-Saldaña *et al.*, 1983; Selby *et al.*, 1984) tiene 66 Kb, en los cuales se disponen los genes *hGH-N* (variante pituitaria de la *hGH*), *hPL₁*, *hPL₄*, *hGH-V* (variante placentaria de la *hGH*) y *hPL₃* intercalados por secuencias de repetición denominadas “Alu” (Lacroix *et al.*, 2002). Los 5 genes presentan la misma orientación transcripcional y están compuestos por 5 exones separados por 4 intrones (Figura 1) (Boguszewski *et al.*, 1998).

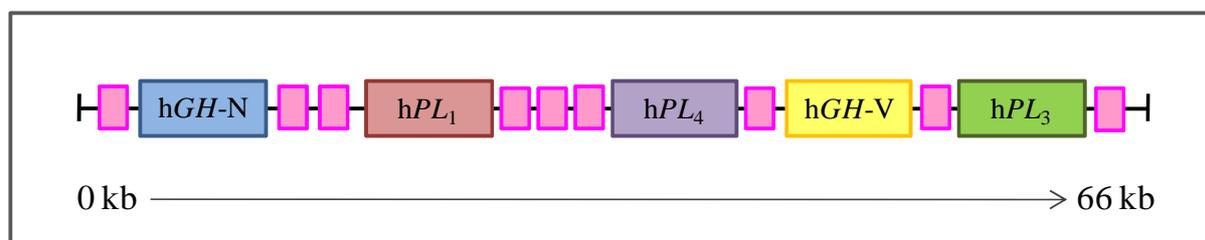


Figura 1. Representación esquemática del cluster *hPL/hGH*. *hGH-N*, variante pituitaria de la hormona del crecimiento humana; *hPL₁*, *hPL₄* y *hPL₃*, lactógeno placentario humano; *hGH-V*: variante placentaria de la hormona del crecimiento humana. Intercaladas entre los genes se representan las las secuencias “Alu”.

1. INTRODUCCION

Respecto a la expresión de cada uno de los 5 genes, el gen *hGH-N* se expresa en la glándula pituitaria anterior, mientras que la expresión de los genes *hPL₁*, *hPL₃*, *hPL₄* y *hGH-V* está localizada en la placenta (Nachtigal *et al.*, 1993).

El lactógeno placentario humano se encuentra codificado indistintamente por los genes *hPL₃* y *hPL₄*. Ambos genes tienen una similitud del 98% y codifican proteínas maduras idénticas, con la única diferencia de un aminoácido en la posición 24 del péptido-señal, donde el *hPL₃* tiene una alanina y el *hPL₄* una prolina (Walker *et al.*, 1991) (ANEXO). El gen *hPL₁* parece haber divergido de la estructura de los genes *hPL₃* y *hPL₄*, y está considerado un pseudogen, ya que aunque su promotor es funcional, el análisis de su secuencia ha revelado múltiples mutaciones en lugares de “splicing” (Selvanayagam *et al.*, 1984) que provocan que no se sintetice la proteína (Reséndez-Perez *et al.*, 1990).

Además, existe una gran similitud entre el *hPL* y la *hGH* que queda patente tanto a nivel de aminoácidos como de nucleótidos, incluso en sus regiones no traducidas e intrones (Barrera-Saldaña *et al.*, 1982). Los mRNA de los genes *hPL* y *hGH* tienen un 92-95% de similitud, y como ya se ha comentado anteriormente, presentan la misma estructura génica (ANEXO). Por el contrario, ambos genes se expresan en tejidos diferentes; el gen *hPL* en la placenta y el gen *hGH-N* en la glándula pituitaria, como se ha comentado anteriormente.

El lactógeno placentario posee un 1% de la actividad promotora del crecimiento de la *hGH-N*, y además, estimula el transporte de aminoácidos, la incorporación de timidina, la mitogénesis y la liberación del factor similar a la insulina (IGF-I) en cultivos de fibroblastos. También se ha estudiado el papel regulador del *hPL* sobre la lipólisis (Walker *et al.*, 1991).

Por otro lado, tiene efectos sobre la diferenciación de la glándula mamaria, la esteroidogénesis, y el metabolismo intermedio. Pero sobre todo, cabe destacar su papel clave en la adaptación de los islotes de Langerhans en el embarazo (Brelje *et al.*, 1993). Los islotes de Langerhans se encuentran dispersos por el páncreas, y están constituidos por tres tipos celulares: células α que secretan glucagón, células β que secretan insulina y células δ que secretan somatostatina. Durante el embarazo se produce un aumento de la demanda de insulina, por lo que resulta esencial que los islotes de Langerhans sufran cambios funcionales y estructurales. Brelje *et al.* (1993) proponen que el lactógeno es el principal responsable de los cambios en los islotes. El lactógeno ejerce su función a través de los receptores celulares de la PRL que pertenecen a la superfamilia de receptores citoquina clase I (Vasavada *et al.*, 2000). Estos receptores interaccionan con los miembros de la familia de tirosina kinasas JAK (Janus Kinasa), que una vez activadas, fosforilan un miembro de la familia de factores de

1. INTRODUCCION

transcripción STAT (Signal Transduction and Activators of Transcription) (Nielsen *et al.*, 2001). Estos factores se dimerizan y translocan al núcleo para regular la expresión de genes específicos como los del receptor de la PRL, el transportador de la glucosa, la glucokinasa, la insulina y otros (Sorenson y Brelje, 1997).

Los cambios que sufren las células β secretoras de insulina se traducen en un aumento de la división celular y de la sensibilidad a la glucosa (Sorenson y Brelje, 1997). Además, sufren otros cambios como el aumento de la síntesis y secreción de insulina estimulada por la glucosa, el aumento de las uniones GAP entre las células β y el aumento del metabolismo del adenosin monofosfato cíclico (Brelje *et al.*, 1993).

1.2. El lactógeno y el tratamiento de la diabetes

El hecho de que el lactógeno placentario sea capaz de inducir cambios tan notables en las células β de los islotes de Langerhans lo convierten en una proteína interesante desde el punto de vista del tratamiento de una enfermedad tan extendida como la Diabetes.

El término *diabetes mellitus* describe un desorden metabólico caracterizado por una hiperglucemia crónica. Las células β pancreáticas no son capaces de secretar la cantidad necesaria de insulina para normalizar los niveles de glucosa en la sangre (diabetes tipo 1), o por otro lado, los tejidos periféricos no responden adecuadamente a la insulina (diabetes tipo 2) (Vasavada *et al.*, 2006).

La gravedad de la enfermedad aumenta considerablemente si tenemos en cuenta el número de personas afectadas por la misma. Solo en EE.UU existían 17.5 millones de personas (casi el 6% de la población) diagnosticadas en 2007 (Dall *et al.*, 2008). La estimación de afectados por esta enfermedad para el año 2030 es de 366 millones de personas (Wild *et al.*, 2004). Además, se estima que el 10% de los afectados son diabéticos tipo 1 (García-Ocaña *et al.*, 2001b). El coste económico asociado a la diabetes en EE.UU fue de 174 mil millones de dólares en 2007, según el estudio realizado por la Asociación Americana para la Diabetes (Dall *et al.*, 2008). Estos datos ponen de manifiesto la envergadura del problema de esta enfermedad.

Los procesos de regulación de las células β pancreáticas han tomado gran importancia debido a los avances surgidos con los trasplantes de islotes de Langerhans como tratamiento contra la diabetes. Sin embargo, el éxito de estos trasplantes se ve reducido debido a la destrucción autoinmune que sufren los injertos (García-Ocaña *et al.*, 2001b). Este problema se soluciona parcialmente mediante un nuevo protocolo de trasplante que utiliza bajas dosis de

1. INTRODUCCION

inmunosupresores libres de glucocorticoides (Shapiro *et al.*, 2000). De esta manera se demuestra que el trasplante de islotes en humanos puede ser una opción terapéutica importante para el tratamiento de la diabetes tipo 1. Sin embargo, esta alternativa terapéutica presenta un gran inconveniente, ya que para cada paciente trasplantado se necesitan los páncreas de entre 2 y 4 personas. Dependiendo del peso del receptor y del número de islotes aislados del páncreas donante, puede ser necesaria una segunda o tercera inyección de otros tantos donantes para poder alcanzar la masa de islotes suficiente que posibilite la independencia a la insulina (Díaz *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta, el número de personas afectadas por esta enfermedad en el mundo, solo en EE.UU se necesitarían más de 7 millones de donantes.

Con el fin de aumentar la disponibilidad de islotes pancreáticos se desarrollan diferentes estrategias, entre ellas, aumentar *in vitro* la masa de las células de los islotes mediante el incremento de su proliferación y supervivencia (Vasavada *et al.*, 2006). Entre los factores que determinan la masa y proliferación de las células β se encuentran los factores de crecimiento (Chang-Chen *et al.*, 2008). El lactógeno placentario, uno de estos factores de crecimiento, ha demostrado ser un potente agente mitógeno, incrementando la proliferación y la masa celular de los islotes (García-Ocaña *et al.*, 2001b), así como favoreciendo la formación de grupos celulares (Fleenor *et al.*, 2000). Además es capaz de aumentar el contenido y la secreción de insulina (Vasavada *et al.*, 2000).

El lactógeno, junto con el factor de crecimiento de hepatocitos (García-Ocaña *et al.*, 2001a; López-Talavera *et al.*, 2004) y la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (Cebrian *et al.*, 2002), son las únicas proteínas capaces de producir hiperplasia de las células β e hipoglucemia mediada por la insulina (Cozar-Castellano *et al.*, 2006).

La muerte celular es el factor principal en la pérdida de masa celular tanto en la diabetes tipo 1 y 2, como en los trasplantes (Chang-Chen *et al.*, 2008). El lactógeno placentario es capaz de proteger a las células β frente a estreptozotocina y dexametasona, dos potentes inductores de muerte celular (Fujinaka *et al.*, 2007).

En definitiva, el hPL puede ser añadido a la pequeña lista de factores de crecimiento con capacidad para mejorar los tres parámetros críticos que determinan el empleo de las células β en los trasplantes: función, proliferación y supervivencia.

Actualmente, el hPL disponible comercialmente se purifica directamente a partir de tejido placentario (por ejemplo, NeoMarkers, EE.UU; Affiland, Bélgica), con el riesgo biológico que ese proceso conlleva. Además, la escasa disponibilidad del tejido y los métodos

1. INTRODUCCION

de purificación empleados, suponen un encarecimiento en el precio final del hPL en el mercado.

La potencialidad del lactógeno como molécula terapéutica en el tratamiento de la diabetes, y la falta de disponibilidad de la misma, hace muy interesante el desarrollo de nuevos sistemas de obtención y/o producción. El disponer de una fuente alternativa más segura y barata permitiría llevar a cabo diferentes investigaciones y ensayos clínicos asociados al tratamiento de la diabetes.

En los últimos años otros grupos de investigación han desarrollado sistemas de producción heterólogos basados en el empleo de *Escherichia coli* (Lan *et al.*, 2006). En estos sistemas se han obtenido elevados niveles de lactógeno humano recombinante, no obstante, la proteína se produce retenida en cuerpos de inclusión, lo que implica procesos de desnaturalización y renaturalización que encarecen el precio final de las proteínas recombinantes (Daniell *et al.*, 2001). Además, en el proceso de solubilización de los cuerpos de inclusión se pierde parte de la proteína purificada (Fernández-San Millán *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2006).

Los organismos vegetales presentan una alternativa interesante que ofrece grandes ventajas para la producción de proteínas humanas, gracias a sus bajos costes de producción, su capacidad de escalado y la seguridad del producto. Las plantas y las suspensiones celulares vegetales, podrían presentarse como un sistema idóneo que nos permita producir lactógeno placentario humano biológicamente activo.

1.3. Sistemas heterólogos para la producción de proteínas biofarmacéuticas

Las moléculas biofarmacéuticas representan actualmente el principal soporte de la industria biotecnológica. Las estimaciones económicas para el mercado global de proteínas terapéuticas humanas producidas en sistemas recombinantes son de 70 mil millones de dólares, 14 de los cuales serían aportados por la insulina, y 20 por los anticuerpos monoclonales (Gerlach *et al.*, 2010). A medida que aumenta el conocimiento médico y biológico sobre muchas enfermedades humanas, se van identificando nuevas proteínas que podrían utilizarse para el tratamiento de las mismas. Disponer de un sistema de producción eucariótico alternativo para satisfacer la demanda de estas moléculas es realmente interesante (Fisher y Emans, 2000; Kermode, 2006).

Tradicionalmente, la industria farmacéutica y las empresas biotecnológicas han utilizado sistemas basados en biorreactores (bacterias y levaduras) y sistemas celulares de

1. INTRODUCCION

mamífero (células de ovario de hámster chino “CHO”, células Namalwa, etc.) para producir proteínas recombinantes. Sin embargo, estos sistemas tienen ciertas limitaciones para satisfacer la creciente demanda de proteínas biofarmacéuticas, cuyos mercados crecen rápida y continuamente (Knäblein, 2005).

Los microorganismos como *E. coli* son un sistema de producción que permiten la producción a gran escala. Su genética está bien caracterizada y no requiere medios de cultivo excesivamente caros (Walsh, 2005). Sin embargo, son incapaces de realizar las modificaciones post-traduccionales que requieren muchas proteínas de origen animal para ser biológicamente activas. Las bacterias sintetizan grandes cantidades de proteínas, pero en muchos casos dan lugar a la aparición de cuerpos de inclusión, que en el caso de que permitan la resuspensión de la proteína, hacen más difícil y costoso el proceso de obtención de la misma en su forma activa. Asimismo, este sistema conlleva cierto riesgo de contaminación del producto con endotoxinas (Fisher y Emans, 2000; Daniell *et al.*, 2001; Goldstein y Thomas, 2004).

Las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) poseen las ventajas de los organismos unicelulares, y además son eucariotas. Sin embargo, estos organismos tienden a hiperglicosilar las proteínas, produciendo patrones de glicosilación diferentes a los de los organismos nativos (Fischer *et al.*, 1999a; Gomord y Faye, 2004).

Las células de mamífero son capaces de glicosilar y procesar las proteínas recombinantes como lo haría el hospedador nativo, pero su cultivo tiene elevados costes económicos, el escalado es muy limitado, y existe el riesgo de propagar patógenos humanos mediante su manipulación (Fisher *et al.*, 1999a; Daniell *et al.*, 2001).

Otro sistema basado en organismos eucariotas son los animales transgénicos, que favorecen la escalabilidad de la producción, si bien la obtención de un animal transgénico requiere hasta 2 años de trabajo (Knäblein, 2005). La metodología empleada para obtener animales transgénicos tiene bajas frecuencias de éxito y además, el sistema requiere de grandes inversiones para la puesta en marcha y el mantenimiento del mismo (Hunter *et al.*, 2005). Por otro lado la utilización de animales para producir proteínas recombinantes está muy limitada debido a restricciones legales y éticas (Fischer *et al.*, 1999a).

1.4. Sistemas heterólogos vegetales

El estudio de la biología de *Agrobacterium tumefaciens*, junto con el desarrollo de la ingeniería genética y su aplicación a la biología vegetal, han revolucionado la agricultura y

1. INTRODUCCION

contribuido al crecimiento de la industria biotecnológica (Teli y Timko, 2004). La habilidad de las plantas para integrar y expresar genes foráneos ha posibilitado la obtención de cultivos genéticamente modificados con diferentes aplicaciones. Además de producir biopolímeros, fármacos o alimentos, las plantas son capaces de limpiar el suelo de compuestos contaminantes, un proceso al que se denomina fitorremediación (Gleba *et al.*, 1999).

La primera generación de plantas transgénicas la forman cultivos resistentes a herbicidas o insectos (maíz MON 810 de Monsanto), mientras que la segunda generación representa a aquellas con aportes nutricionales, siendo los ejemplos más conocidos el “Golden rice” o arroz dorado, y el tomate Flavr SavrTM (Calgene). La tercera generación de plantas la forman aquellas que producen proteínas de interés biofarmacéutico para su uso terapéutico (Spök *et al.*, 2008).

Los sistemas vegetales representan múltiples ventajas y gran versatilidad para hacer frente a las limitaciones de los sistemas de producción previamente citados. La síntesis de proteínas es un proceso altamente conservado entre organismos vegetales y animales, de manera que las células vegetales son capaces de plegar correctamente las proteínas y de realizar las modificaciones post-traduccionales de forma similar a las células animales (Kamenarova *et al.*, 2005). Por esta razón, los transgenes humanos que se expresan en plantas producen proteínas con secuencias de aminoácidos iguales a sus homólogas humanas, lo que asegura la calidad del producto (Schillberg y Twyman, 2007).

Las células vegetales carecen de patógenos animales o humanos por lo que la seguridad del producto es mayor que en los sistemas eucariotas convencionales (Kermode, 2006). Además, son capaces de producir todo tipo de proteínas, desde pequeños péptidos hasta complejas moléculas multiméricas como las inmunoglobulinas (Twyman *et al.*, 2003).

En términos económicos, los sistemas vegetales son mucho más ventajosos por la eficiencia en los costes, la facilidad para el cultivo y el almacenamiento, así como el escalado (Benchabane *et al.*, 2008). Las plantas transgénicas posibilitan aumentar o disminuir el área de cultivo dependiendo de la demanda del producto. Se ha estimado que los costes de producción de una proteína recombinante en plantas es entre 10 y 50 veces menor que en *E. coli* (Knäblein, 2005). Este hecho, unido a la disponibilidad de infraestructuras de cosechado, almacenamiento y transporte, las hace muy atractivas como sistema de producción (Kusnadi *et al.*, 1997).

Una alternativa interesante a las plantas transgénicas son las suspensiones celulares. La disponibilidad de líneas celulares bien caracterizadas y optimizadas, como la línea de tabaco “Bright Yellow-2” (BY-2) (Mayo *et al.*, 2006), permiten la obtención de líneas

1. INTRODUCCION

transgénicas utilizando *A. tumefaciens* (An, 1985). Estas células crecen formando agregados celulares desorganizados y desdiferenciados a los que se denomina “callo”. Estos callos son disgregados y cultivados en medio líquido dando lugar a la obtención de suspensiones celulares (Hellwig *et al.*, 2004). Debido a la naturaleza desdiferenciada de las células que forman los callos, éstas carecen de plasmodesmos funcionales, por lo que la comunicación entre células es mínima (Su, 2006). Esto puede reducir el silenciamiento post-transcripcional sistémico, ya que se evita la transmisión de señales entre células (Doran, 2000). Paralelamente, existe la posibilidad de inducir este tipo de tejido a partir de plantas transgénicas.

El cultivo de las suspensiones celulares en biorreactores permite que la producción de proteínas se haga bajo condiciones certificadas GMP (buenas prácticas de manufacturación) y GLP (buenas prácticas de laboratorio). La certificación GMP fue establecida por la Organización Mundial de la Salud, para garantizar un nivel de calidad óptimo durante el proceso de producción y procesamiento de las proteínas biofarmacéuticas (Knäblein, 2005). De esta manera, se asegura que la elaboración de estos productos se realiza según métodos y procesos validados, garantizando la trazabilidad y consistencia de lote a lote (Ma *et al.*, 2005b). La certificación GMP ayuda a cubrir las necesidades de regulación más fácilmente (Spök *et al.*, 2008). Además, supone una gran ventaja para la producción de proteínas terapéuticas de alto valor comercial destinadas al uso clínico que requieran un alto grado de pureza, ya que permite utilizar condiciones de cultivo estériles y controladas (Fischer *et al.*, 1999b; Doran, 2000). El control del crecimiento celular en los biorreactores posibilita operar con ciclos de producción más cortos (Doran, 2006b), y gracias a la gran variedad de equipos disponibles, existen multitud de estrategias de producción que pueden aumentar la producción de la proteína recombinante (Huang y McDonald, 2009).

El cultivo de células en suspensión permite también secretar las proteínas recombinantes al medio de cultivo, dependiendo del péptido señal utilizado y del tamaño de la proteína de interés (Fischer *et al.*, 1999b). Este hecho favorece su aislamiento y purificación, ya que la composición del medio es relativamente simple, con ausencia de proteínas contaminantes y metabolitos secundarios, lo que implica una reducción de los costes asociados a este proceso (Hellwig *et al.*, 2004; Doran, 2006a). Otra ventaja de la utilización de suspensiones celulares es que se elimina el riesgo de liberar organismos genéticamente modificados al medio ambiente, ya que las células son cultivadas en sistemas confinados (Spök *et al.*, 2008). Este sistema se ha utilizado ampliamente para la producción de moléculas de interés terapéutico (Tabla 1).

1. INTRODUCCION

Tabla 1. Proteínas de interés farmacéutico producidas en suspensiones celulares de tabaco. Los niveles de producción se expresan como cantidad de proteína por peso fresco (g^{-1}) o por litro de cultivo (l^{-1}), excepto en los casos en que se representa como porcentaje de proteína respecto a la cantidad de proteína total soluble PTS (%).

Proteína	Aplicación terapéutica	Cultivar	Nivel de producción	Referencia
Ac ¹ anti-HIV-1	Prevención /tratamiento VIH-1	BY-2	2,9 $\mu g g^{-1}$	Sack <i>et al.</i> (2007)
Ac. anti-PAc	Caries	XD6S	0.1-0.4g l^{-1}	Yano <i>et al.</i> (2006)
HBsAg	Hepatitis B	NT-1	198 ng g^{-1}	Shekhawat <i>et al.</i> (2007)
Stx2 (toxina Shiga)	Antígeno vacunal para tratar el síndrome urémico hemolítico	NT-1	8.2 $\mu g g^{-1}$	Wen <i>et al.</i> (2006)
Intimina	Colitis y diarrea hemorrágicas	BY-2	13 $\mu g g^{-1}$	Judge <i>et al.</i> (2004)
IL-12	Promoción de la respuesta inmunitaria tipo Th1	Havana	175 $\mu g l^{-1}$	Kwon <i>et al.</i> (2003)
Lactoferrina humana	Proteína antimicrobiana	BY-2	0.7-2.7%	Choi <i>et al.</i> (2003)
hGM-CSF	Anemia aplásica y neutropenia	Havana	150 $\mu g l^{-1}$	Kim <i>et al.</i> (2004)
DSPA α 1	Tratamiento de trombosis	BY-2	1.5 $\mu g g^{-1}$	Schiermeyer <i>et al.</i> (2005)
Trombomodulina	Anticoagulante	BY-2	27 $\mu g g^{-1}$	Schinkel <i>et al.</i> (2005)
Transglutaminasa	Diagnosís en la enfermedad celíaca	BY-2	0.6-2.6%	Sorrentino <i>et al.</i> (2005)
sCD14 humana	Sistema inmune, reacciones inflamatorias	BY-2	5 $\mu g l^{-1}$	Girard <i>et al.</i> (2004)

¹Anticuerpo.

Las células vegetales tienen patrones de glicosilación ligeramente diferentes a los de las células animales, debido a que la maduración de los glicanos en el aparato de Golgi es diferente (Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007). Las células vegetales no dejan residuos de ácido siálico, presente en glicoproteínas humanas, y añaden fucosa y xilosa, residuos responsables de la alergenicidad de las glicoproteínas vegetales (Chen *et al.*, 2004; Gomord *et al.*, 2004). Muchas proteínas humanas de uso terapéutico sufren esta modificación post-traduccional que resulta esencial para el plegamiento, transporte y tiempo de vida medio (Joshi y Lopez, 2005). Para obtener proteínas con estructuras N-glicosiladas “humanizadas” hay que evitar la glicosilación específica de las células vegetales. Una estrategia muy utilizada es la retención endoplasmática, evitando el paso por el aparato de Golgi mediante la adición de la secuencia KDEL en la proteína recombinante (Gomord y Faye, 2004). Utilizando esta estrategia, se han obtenido anticuerpos sin epítopos antigénicos que mantienen su actividad terapéutica (Tekoah *et al.*, 2004). Otra posibilidad se basa en la inactivación de las glicosiltransferasas vegetales presentes en el aparato de Golgi, mediante técnicas de RNA (ácido ribonucleico) interferente para obtener plantas “glicomodificadas” que producen anticuerpos con estructuras de glicanos similares a los humanos (Strasser *et al.*, 2008). La humanización de la N-glicosilación

1. INTRODUCCION

producida por las células vegetales también se puede conseguir mediante la expresión de glicosiltransferasas de mamífero en plantas, de manera que compitan con las enzimas endógenas (Gomord *et al.*, 2004). Basándose en esta hipótesis de complementación, se han obtenido plantas transgénicas de tabaco que expresan la enzima humana β -(1,4)-galactosiltransferasa de forma estable, permitiendo producir anticuerpos con N-glicanos parcialmente galactosilados, tal y como lo hacen las células de hibridoma (Bakker *et al.*, 2001).

Actualmente se están desarrollando sistemas heterólogos vegetales basados en especies alternativas, como microalgas y musgos, que también son cultivadas en sistemas confinados.

Las microalgas son organismos unicelulares con elevadas tasas de crecimiento (Wang *et al.*, 2008) que permiten tanto la transformación nuclear como cloroplástica (Manuell *et al.*, 2007). Actualmente solo se dispone de protocolos de transformación bien establecidos para tres especies de microalgas, lo que pone de manifiesto la necesidad de seguir investigando para desarrollar toda la potencialidad de este sistema (Walker *et al.*, 2005).

El musgo *Physcomitrella patens* posee una alta frecuencia de recombinación homóloga, y se cultiva en medios simples que solo requieren agua, minerales, CO₂ y luz (Decker y Reski, 2007). La disrupción de los genes α -(1,3)-fucosiltransferasa y β -(1,2)-xilosiltransferasa mediante mutaciones dirigidas ha permitido la obtención de musgos que no producen glicoproteínas alergénicas (Koprivova *et al.*, 2004). Sin embargo, la utilización de células fotosintéticas requiere luz artificial y que ésta penetre de forma adecuada en los biorreactores, un reto aún sin solventar, que además genera un gran coste económico (Weathers *et al.*, 2010). En cualquier caso, este es un sistema con gran potencial para la producción de proteínas terapéuticas en el futuro.

La elección del sistema heterólogo de expresión adecuado para producir una proteína determinada es una decisión que depende de diversos factores (Fischer *et al.*, 1999a). Los costes de producción, el volumen de mercado, la seguridad y la estabilidad del producto son algunos factores a tener en cuenta (Doran., 2000). Además, cada proteína es un caso diferente, que requiere un análisis empírico de su sistema de producción idóneo.

A pesar de las grandes ventajas que ofrecen las plantas para producir proteínas terapéuticas, la mayoría de los productos que han alcanzado el mercado son producidos en líneas celulares de mamífero (células CHO) o *E. coli* (Walsh, 2005). Las primeras proteínas producidas en plantas que han alcanzado el mercado son la avidina, aprotinina, lisozima, lactoferrina y tripsina, producidos en maíz, y comercializados por Prodigene y Sigma (Hood,

1. INTRODUCCION

2002; Howard, 2005; Ma *et al.*, 2005b). Estas proteínas se utilizan como reactivos de diagnóstico y en procesos industriales (Spök, 2007). En 2006 la empresa Dow AgroSciences consiguió la aprobación del Departamento de Agricultura de los EE.UU para producir la primera vacuna de uso terapéutico en suspensiones celulares de tabaco, la vacuna contra la enfermedad de Newcastle que afecta a la producción avícola. Asimismo, ese mismo año en Cuba se aprueba la producción a gran escala de un anticuerpo producido en plantas para purificar un antígeno vacunal (Pujol *et al.*, 2007; Sparrow *et al.*, 2007). La empresa SemBiosys tiene previsto comercializar insulina humana producida en semillas de cártamo (o alazor) para el año 2012 (<http://www.sembiosys.com>).

Muchas otras proteínas de uso terapéutico se encuentran en diferentes fases de ensayos clínicos, por lo que en unos años muchas de ellas podrían alcanzar el mercado de biofármacos (Spök *et al.*, 2008). En la Unión Europea, la empresa Meristem Therapeutics produce lipasa gástrica (Merispase) en maíz cultivado en campo abierto a la espera de escalar el proceso a 1000 hectáreas tras la autorización de la Comunidad Europea para su comercialización (Spök, 2007).

Actualmente hay dos moléculas producidas en plantas que se han aprobado para su uso en humanos: un anticuerpo contra la caries (CaroRx™) producido por Planet Biotechnology, y un factor intrínseco humano para el tratamiento de la deficiencia de vitamina B12 producido por Cobento Biotech AS (Faye y Gomord, 2010).

1.5 Elementos determinantes para la producción de proteínas en sistemas heterólogos vegetales

Muchos autores coinciden en señalar que una de las limitaciones de los sistemas heterólogos vegetales es su bajo nivel de expresión. Incrementar la cantidad de proteína heteróloga es crucial para que el sistema sea económicamente viable. Para ello debemos tener en cuenta algunos factores que resultan determinantes a la hora de optimizar la producción, como la elección del hospedador, el tipo de tejido, el vector de expresión y el proceso de purificación.

Cada especie vegetal presenta determinadas ventajas, que junto con las características de la proteína de interés, hace que unos resulten más apropiados que otros. La facilidad de transformación genética y de cultivo *in vitro*, la cantidad de biomasa, la infraestructura agrícola disponible y los costes de procesamiento tras la cosecha, son los factores más

1. INTRODUCCION

importantes que determinan la adecuación del hospedador (Twyman *et al.*, 2003; Goldstein y Thomas, 2004).

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) es una de las especies más empleada en transformación vegetal debido a que posee protocolos bien establecidos para su transformación, produce gran cantidad de biomasa y ofrece un rápido escalado junto con la disponibilidad de una infraestructura para su procesamiento (Fischer *et al.*, 2004b). Es la especie elegida por muchas compañías biotecnológicas cuyas proteínas recombinantes se encuentran en diferentes fases de ensayos clínicos (Fischer *et al.*, 2004a). Uno de los aspectos más ventajosos de la producción de proteínas recombinantes en plantas de tabaco se basa en la variedad de estrategias de expresión disponibles (Tremblay *et al.*, 2010). Esta especie también posee alcaloides lo que dificulta la producción de proteínas biofarmacéuticas ya que es necesario eliminar estos compuestos totalmente y podría suponer un encarecimiento del proceso de purificación. Sin embargo, existen cultivares con bajos niveles de alcaloides, como el 81V9 (Li *et al.*, 2006), y el cultivo de células BY-2 en suspensión minimiza la producción de estos metabolitos (Nagata *et al.*, 1992). Además, el tabaco no es una especie dedicada a la alimentación humana o del ganado, por lo que no representa un riesgo de contaminación de la cadena alimentaria (Commandeur *et al.*, 2003).

De esta manera, el tabaco ofrece gran flexibilidad para satisfacer las demandas del mercado, a la vez que destaca por la variedad de opciones de producción que ofrece. Su importancia queda bien reflejada en el número de proteínas recombinantes con interés farmacéutico que se han producido hasta la fecha (Tabla 2). Anticuerpos, antígenos vacunales, hormonas, citoquinas y proteínas séricas son solo algunos de los ejemplos que podemos encontrar.

1. INTRODUCCION

Tabla 2. Producción de proteínas biofarmacéuticas en plantas de tabaco. Los niveles de producción se representan como cantidad de proteína por peso fresco, excepto en los casos en que se expresan como porcentajes respecto a la cantidad de proteína total soluble (PTS).

Proteína	Aplicación médica	Tejido	Cultivar/sp	Nivel de expresión	Tipo de transformación	Referencia
Ac ¹ anti-BoNT/A	Botulismo	hoja	81V9	20-40 mg kg ⁻¹	Estable (nuclear)	Almquist <i>et al.</i> (2006)
Ac. anti-HBsAg	Hepatitis B	hoja	Petit Havana SR1	0.5 % (60µg g ⁻¹)	Estable (nuclear)	Ramírez <i>et al.</i> (2003)
AcM ² CO17-1A	Cáncer colorectal	hoja	Xanthi	0.9 mg kg ⁻¹	Estable (nuclear)	Ko <i>et al.</i> (2005)
DSPAα1	Trombosis arteriales	hoja	Maryland Mammoth	38 µg g ⁻¹ (0.4 %)	Estable (nuclear)	Schiermeyer <i>et al.</i> (2005)
β-glucosidasa	Enfermedad de Gaucher	semilla	Xanthi	720U ³ Kg ⁻¹	Estable (nuclear)	Reggi <i>et al.</i> (2005)
Transglutaminasa humana	Fibrinólisis	hoja	Petit Havana SR1	0.1-1.8 %	Estable (nuclear)	Gao <i>et al.</i> (2004)
Cardiotropina-1	Atrofia muscular	hoja	Petit Havana	0.041-0.51 mg g ⁻¹	Estable (cloroplástica)	Farrán <i>et al.</i> (2008)
Interleuquina 13	Diabetes tipo 1	hoja	81V9	0.15 %	Estable (nuclear)	Wang <i>et al.</i> (2008)
Proteína L1 del papilomavirus humano	Cáncer cervical	hoja	Petit Havana	3 mg g ⁻¹ (24 %)	Estable (cloroplástica)	Fernandez-San Millán <i>et al.</i> (2008)
CD14 humano	Shock séptico	semillas	Xanthi	16 µg g ⁻¹	Estable (nuclear)	Blais y Altosaar (2006)
Sub. B de la toxina del cólera	Cólera	hoja	81V9	0.11 %	Estable (nuclear)	Li <i>et al.</i> (2006)
IGF-1	Diabetes, osteoporosis	hoja	Xanthi	241ng mg ⁻¹ PT ⁴	Estable (nuclear)	Panahi <i>et al.</i> (2004)
hGH	Enanismo hipopituitario	hoja	<i>Nicotiana benthamiana</i>	1 mg g ⁻¹ (10 %)	Transitoria	Gils <i>et al.</i> (2005)

¹Anticuerpo; ²Anticuerpo monoclonal; ³Unidades enzimáticas; ⁴Proteína Total.

El tipo de tejido en el que expresar el gen foráneo también determinará la cantidad final de la proteína. La expresión puede ser dirigida a un tejido determinado, órgano de reserva y/o semilla. El tejido foliar es el más utilizado debido a su rápido crecimiento y a que permite el cosechado coincidiendo con el momento de máxima acumulación de la proteína recombinante (Streatfield, *et al.*, 2007; Benchabane, *et al.*, 2008). Los órganos de reserva permiten almacenar la proteína y conservarla durante un largo periodo de tiempo sin necesidad de cadena de frío (Fischer y Emans, 2000). Sin embargo, los costes de extracción y purificación son mayores para un tejido seco como el de la semilla (Kamenarova *et al.*, 2005).

El diseño del vector de expresión también determina los niveles de síntesis de la proteína heteróloga. Dependiendo de las secuencias reguladoras que empleemos, podemos optimizar la expresión de los transgenes a nivel transcripcional y/o traduccional (Kermode,

1. INTRODUCCION

2006). Para ello contamos con diferentes elementos que nos permiten regular la expresión de los transgenes con el fin de obtener mayores niveles de proteína recombinante.

A nivel transcripcional uno de los elementos más importantes es el promotor. El promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV) es uno de los más empleados, ya que genera elevados niveles de expresión tanto en dicotiledóneas como monocotiledóneas (Kang *et al.*, 2003). La expresión del transgén se debe al efecto combinado de los subdominios A y B, que a su vez se subdividen en otros subdominios. El dominio A exhibe altos niveles de expresión, sobre todo en la raíz, mientras que los subdominios B1-B5 dirigen la expresión con distintos patrones célula- y tejido-específicos (Bhullar *et al.*, 2007). Las regiones -343 a -208 y -208 a -90 son responsables de la activación de la transcripción mientras la región -90 a -46 juega un papel importante en el incremento de la misma (Yoshida y Shinmyo, 2000). No presenta especificidad alguna, habiéndose observado expresión en hoja, tallo, raíz y pétalos (Odell *et al.*, 1985).

El promotor doble 35S del virus del mosaico de la coliflor (2x35S CaMV) está formado por dos repeticiones en tándem de una región de 253 pb descrita como intensificadora, y que está localizada en la región 5' del promotor 35S CaMV (Mitsuhara *et al.*, 1996). La región duplicada actúa como intensificadora en promotores heterólogos, y permite obtener elevados niveles de expresión en plantas transgénicas (Kay *et al.*, 1987).

Otros elementos reguladores como las secuencias terminadoras de la transcripción también son importantes ya que pueden afectar la estabilidad del mRNA (RNA mensajero). En plantas, los terminadores más utilizados son los de la región 3' no traducida del transcrito 35S del CaMV y el del gen *nopalina sintasa* (Mitsuhara *et al.*, 1996).

La inclusión de elementos como las secuencias SAR/MAR (regiones de unión a andamios nucleares/regiones de unión a matrices nucleares) ha sido utilizada como mecanismo para aumentar la expresión de los transgenes. Éstas son secuencias ricas en adenina y timina de entre 300 y 500 pares de bases (pb) de longitud que interaccionan con los andamios nucleares. Estas estructuras se unen a la cromatina, orientándola y facilitando procesos como la replicación y la transcripción mediante el cambio localizado de la topología de la cromatina (Breyne *et al.*, 1992; Allen *et al.*, 1996). La utilización de estas secuencias ha demostrado ser muy útil aumentando el nivel de expresión de los transgenes, estabilizando la expresión en la progenie, y en ocasiones, reduciendo la variabilidad de expresión entre clones (Ulker *et al.*, 1999; Vain *et al.*, 1999; Nowak *et al.*, 2001).

A nivel traduccional, las regiones 5' no traducidas (5'UTR) afectan de manera significativa a la eficiencia de la traducción y al nivel de síntesis de las proteínas (Gallie *et al.*,

1. INTRODUCCION

1989; Gallie y Walbot, 1992). Estas secuencias están localizadas corriente arriba del sitio de inicio de la traducción y facilitan el escaneado de los ribosomas para iniciar este proceso (Sato *et al.*, 2004; Kermode, 2006). Las UTR juegan un papel muy importante en la regulación post-transcripcional de la expresión génica, incluyendo la eficiencia traduccional y la estabilidad del mRNA (Mignone *et al.*, 2002). Las secuencias 5'UTR de mRNA virales como el del virus del mosaico del tabaco (TMV) o el del virus del mosaico de la alfalfa, han sido utilizadas para aumentar la expresión en células de tabaco (Lessard *et al.*, 2002). La secuencia Ω del TMV es una de las más utilizadas, mostrando aumentos en la traducción de hasta 80 veces en protoplastos de tabaco (Turner y Foster, 1995). Esta secuencia es capaz de incrementar la cantidad de proteína en plantas, animales e incluso *E. coli* (Mitsuhara *et al.*, 1996).

Algunos procesos post-traduccionales pueden ser utilizados para aumentar la estabilidad y el procesamiento de las proteínas recombinantes. La dirección de las proteínas a la ruta secretora, además de garantizar el correcto procesamiento de las mismas, puede ser beneficioso para evitar efectos adversos sobre la planta hospedadora, o facilitar el proceso de purificación posterior (Kermode, 2006).

Una de las estrategias más utilizadas para acumular las proteínas recombinantes en plantas es dirigir las al retículo endoplasmático (RE). Para ello, se utiliza la secuencia KDEL, un tetrapéptido compuesto por lisina, aspartato, glutamato y leucina que se encuentra en el extremo carboxilo-terminal de muchas proteínas solubles del RE, como la proteína BiP o la enzima disulfuro isomerasa (Shin *et al.*, 1991). Esta secuencia interactúa con el receptor KDEL, garantizando que la proteína es devuelta al retículo desde el aparato de Golgi (Ellgaard y Helenius, 2003). La delección del extremo carboxilo-terminal de la proteína del retículo grp78 (BiP) supone la secreción de la misma en células COS, mientras que la adición de la misma secuencia en la lisozima de pollo permite acumularla en el retículo (Munro y Pelham, 1987). Como ya se ha comentado anteriormente, la presencia de esta secuencia también posibilita que las glicoproteínas recombinantes no tengan azúcares específicos de las células vegetales, evitando así problemas de alergenicidad. Desde un punto de vista medioambiental, la inclusión de una señal como KDEL evita que las proteínas lleguen al apoplasto, al xilema o al floema, evitando el contacto con microorganismos o insectos (Commandeur *et al.*, 2003).

En ausencia de alguna señal específica como la KDEL, las proteínas que poseen un péptido-señal se dirigen al apoplasto (Ma *et al.*, 2003). La acumulación apoplástica resulta especialmente adecuada cuando la producción de las proteínas de interés se realiza en

1. INTRODUCCION

suspensiones celulares, ya que dependiendo del tamaño de la proteína, ésta alcanzará el medio de cultivo a través de los poros de la pared celular facilitando su recuperación y purificación a partir del mismo (Fischer *et al.*, 2001; Schillberg *et al.*, 2002).

Otros elementos que también forman parte del vector de expresión, pero que no regulan la expresión del transgén, son las pequeñas dianas o “tags” que sirven para facilitar el proceso de purificación. Las dianas de afinidad son secuencias exógenas de aminoácidos con una alta afinidad por un ligando químico o biológico. La purificación mediante la señal His-tag se basa en la utilización de metales quelantes como ligandos de afinidad que son inmovilizados en una matriz de ácido nitriloacético o sefarosa (Hochuli, 1992). Esta señal es una de las más utilizadas, gracias a que permite obtener grandes cantidades de proteína en menos pasos cromatográficos, lo que se traduce en un menor coste económico y de tiempo (Arnau *et al.*, 2006). La purificación de la proteína recombinante es una parte muy importante del proceso de producción biotecnológico, ya que representa una gran parte del coste del proceso; hasta un 85% del coste de producción está asociado a la recuperación de la proteína a partir del tejido vegetal y su purificación posterior (Twyman *et al.*, 2003).

1.6. Aspectos legales del uso de las plantas como biofactorías de producción

A pesar de las grandes ventajas que ofrecen los organismos vegetales para la producción de proteínas terapéuticas de uso humano y animal, su salto al nivel comercial se ve limitado debido a retos específicos que aún persisten.

Uno de estos retos es la regulación de estos organismos. Internacionalmente no existe una regulación armonizada, de modo que hay diferentes organismos reguladores, tanto en EE.UU como en la UE (Gerlach *et al.*, 2010). A nivel Europeo, esta regulación recae sobre diferentes organismos cuya autoridad se ve solapada. Las proteínas producidas en sistemas vegetales no tienen una regulación específica, por lo que se controlan en base a directivas relativas a los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) con resistencias a enfermedades o aportaciones nutricionales, así como a aquellas que controlan la producción de fármacos (Sparrow *et al.*, 2007). La legislación en materia de agricultura biotecnológica se enfrenta a un nuevo tipo de cultivo, mientras que la legislación en materia de fármacos se enfrenta a un nuevo concepto de producción (Spök *et al.*, 2008).

En Europa, cualquier liberación deliberada al medio ambiente de un OGM requiere la notificación a la autoridad nacional competente bajo la Directiva Europea 2001/18/EC, ya sea tanto para fines de I+D, como para su comercialización. El cultivo de OGM's en

1. INTRODUCCION

confinamiento (invernaderos, biorreactores) está regulado por las Directivas Europeas 90/219/EEC y 98/81/EC. La exportación o transporte de OGM's, así como de sus semillas, entre los estados miembro se controla mediante la regulación 1946/2003 (Spök *et al.*, 2008). En el caso de que la liberación del OGM se haga con fines comerciales, la autoridad nacional competente es la que evalúa la aplicación, al tiempo que la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) realiza su propia evaluación. Alternativamente, la solicitud puede ser enviada directamente a la EFSA, quien revisa la solicitud bajo el reglamento 1829/2003/EU sobre alimentos y piensos modificados genéticamente (Sparrow *et al.*, 2007).

Por otro lado, los productos farmacéuticos producidos en plantas han de adherirse a las regulaciones de la norma 2309/93/EU. Esta regulación es supervisada por la autoridad nacional competente durante la fase clínica inicial, y por la Agencia Europea para la Evaluación de los Medicamentos durante la fase de desarrollo comercial y su aplicación.

En España, las directivas relativas a los OGM se han incorporado mediante la Ley 9/2003 y el Real Decreto 178/2004 por el que se aprueba el reglamento para el desarrollo y ejecución de dicha ley. La Administración General del Estado es competente para autorizar la liberación voluntaria y la utilización confinada de OGM's, así como la comercialización, importación y exportación de los mismos o de productos que los contengan, en los términos que marca la Ley previamente citada (Ruiz Galán *et al.*, 2005). Las liberaciones voluntarias llevadas a cabo en España se basan mayoritariamente en OGM's con resistencia a herbicidas o a insectos. Se han notificado algunas liberaciones de OGM's que producen en su mayoría vacunas de uso veterinario, y alguna de uso humano contra la hepatitis C (<http://www.mma.es>). Las Comunidades Autónomas también son competentes para conceder autorizaciones de utilización confinada y liberación voluntaria con fines de I+D, pero no para su comercialización. Asimismo, son las responsables de la vigilancia e imposición de sanciones.

A nivel internacional, el Protocolo de Cartagena en Bioseguridad tiene como objetivo contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la transferencia, manipulación y uso de OGM que pudieran tener un efecto negativo sobre la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2000).

La gestión de la propiedad intelectual (IP) facilita la comercialización y distribución de las plantas productoras de proteínas terapéuticas. Además, si el objetivo de la tecnología es humanitario, saber gestionar correctamente la IP es de vital importancia (Kowalski *et al.*, 2002). La gestión de la IP abarca las patentes, la protección de información confidencial y la formación de programas cooperativos de investigación y desarrollo (Ma *et al.*, 2005a). A este

1. INTRODUCCION

respecto, en 2004 se estableció un consorcio de investigación académica fundado por la UE, conocido como Pharma-Planta. Este consorcio está formado por investigadores que han firmado una declaración de intenciones para el uso humanitario de todos los conocimientos generados durante el proyecto (Ma *et al.*, 2005a; Sparrow *et al.*, 2007).

Otro punto clave para las plantas productoras de fármacos son los relacionados con la evaluación y gestión de los riesgos para la salud humana y el medio ambiente, debido al rechazo que generan estos cultivos en la sociedad (Peterson y Arntzen, 2004). Existen multitud de mecanismos de contención de transgenes y proteínas recombinantes a nivel científico (Daniell *et al.*, 2001; Commandeur *et al.*, 2003). Desde el punto de vista jurídico, las leyes regulan también cómo han de liberarse los OGM's, tal y como se ha comentado anteriormente. En España las actividades de evaluación de riesgos son realizadas por el Ministerio de Medio Ambiente, con la ayuda de la Comisión Nacional de Bioseguridad, un órgano consultivo cuya función es informar sobre las solicitudes de autorización y que está adscrito al propio ministerio.

Pese a su claro potencial como sistema de producción, las plantas siguen teniendo el reto de optimizar todos los parámetros científicos previamente comentados, así como los aspectos legales de los que depende la producción a gran escala.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido la obtención de lactógeno placentario humano recombinante utilizando plantas transgénicas de tabaco. Para ello se han abordado los siguientes objetivos parciales:

- Construcción de los vectores de expresión vegetales donde la expresión del transgén se regula mediante los promotores 35S CaMV y 2x35S CaMV
- Obtención de plantas transgénicas que producen lactógeno placentario humano y caracterización molecular de las mismas
- Purificación de la proteína recombinante y determinación de su actividad biológica
- Estudio de la estabilidad de la proteína recombinante en planta y de la transmisión del transgén a la siguiente generación
- Establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos transgénicos y caracterización de las mismas

3.1. Materiales

3.1.1. Material vegetal

Las semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi) fueron facilitadas por el Dr. Javier Legorburu (Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, NEIKER-Tecnalia).

Tras la esterilización de las semillas con lejía comercial al 15%, se cultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (4.4 g l⁻¹ MSMO Sigma, 3% de sacarosa, 0.8% agar). Las plántulas fueron subcultivadas mensualmente por propagación de yemas apicales en el mismo medio. Las condiciones de cultivo *in vitro* fueron las siguientes: 23°C de temperatura constante, fotoperiodo de día largo (16 horas de luz) y flujo fotónico de 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las plantas se transfirieron al invernadero, donde tras el lavado de las raíces con abundante agua para eliminar los restos de medio sólido, fueron introducidas en un sustrato compuesto por turba y vermiculita (1:1) y cultivadas a 28°C.

3.1.2. Microorganismos

Para la clonación de la secuencia del gen *hPL* se utilizó la cepa de *E. coli* INV α F': F' *endA1 recA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) supE44 thi⁻¹ gyrA96 relA1 ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 λ ⁻, suministrada por Invitrogen™.*

También se utilizó la cepa DH5 α : F' (f80d Lac 2 Δ M15) Δ (LacZYA-argF) U169 *endA1 rec1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) deoR thi⁻¹ supE44 gyrA96 relA1 λ ⁻, para la construcción de diferentes vectores plasmídicos.*

Las cepas de *A. tumefaciens* utilizadas en los experimentos de transformación dependieron de la construcción genética empleada. Para los procesos de transformación usando el vector pNEKhPL1 se usó la cepa EHA105, mientras que para los procesos de transformación utilizando el vector pNEKhPL2 se usó la cepa GV3101:pMP90RK.

Los genotipos de estas cepas son las siguientes:

EHA105: pTiBo542 Δ T-Rif^R.

GV3101: pMP90RK. Gm^R Km^R Rif^R. Contiene los genes *RK2 replicasa* y *trf* necesarios para la replicación del vector integrados en su genoma.

3.1.3. Vectores

El vector binario pGJ2750, utilizado para la construcción del vector pNEKhPL1, fue cedido por el Institut Max Planck (Colonia, Alemania). Este vector contiene el promotor 35S CaMV. Como agentes de selección, posee las secuencias de los genes *nptII* (*neomicina fosfotransferasa*) y *aadA* (*aminoglicósido-3-adenililtransferasa*) que confieren resistencia frente a la kanamicina y la estreptomicina, respectivamente.

El vector binario pTRAc, utilizado para la construcción del vector pNEKhPL2, fue cedido por el Institut für Biology VII (Aachen, Alemania). Es un vector derivado del vector pPAM (número de acceso AY027531) y contiene los orígenes de replicación *ColE1* y *RK2* que permiten la replicación del vector en *E. coli* y *A. tumefaciens*, respectivamente. El uso de este vector está condicionado a aquellas cepas de agrobacteria que contienen los genes *RK2 replicasa* y *trf* necesarios para la replicación integrados en su genoma (Hellens *et al.*, 2000). En este vector el transgén está regulado por el promotor 2x35S CaMV y la secuencia 5'UTR de la *calcona sintasa* (CHS) de *Petroselinum crispum*. La señal KDEL permite retener la proteína en el RE, y una cola de 6 residuos de histidina facilita su purificación. Además posee dos regiones SAR del gen *Rb7* de tabaco flanqueando el “cassette” de expresión. La selección se realiza mediante la inserción de los genes *nptII* y *bla* (β -*lactamasa*) que confieren resistencia frente a kanamicina y ampicilina respectivamente.

Para clonar los fragmentos amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el vector pCR[®]2.1 (Invitrogen).

3.1.4. Oligonucleótidos

Para amplificar la secuencia del gen *hPL* se diseñaron los cebadores hPL-F y hPL-R (Tabla 3) en base a las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica, EE.UU) de los genes *hPL*₁ (M15895), *hPL*₃ (NM_020991), *hPL*₄ (NM_001317) y *hGH-V* (K00470). El diseño se realizó a partir de los alineamientos realizados con el programa ClustalX. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por MWG Biotech, excepto los utilizados en los experimentos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, que fueron sintetizados por Metabion.

3. MATERIALES Y METODOS

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
hPL-F	ATG GCT SCA GGC TCC CGG AC
hPL-R	CTA GAA GCC ACA GCT RCC CT
hPL-CUT-F	ACG TCC ATG GCT GCA GGC TCC CGG ACG
hPL-CUT-R	GCA TGG ATC CCT AGA AGC CAC AGC TAC C
hPL-R-NS	TAA AGC GGC CGC GAA GCC ACA GCT ACC
N1-P1	GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG
N1-P2	ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA
P35S	ATC CTT CGC AAG ACC CTT CC
T35S	AGA GAG AGA TAG ATT TGT AGA GA
RT-F	AAC ATG GAG GAA ACG CAA CAG
RT-R	GGA GAT GCG GAG CAG CTC TA
M13-F	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13-R	CAG GAA ACA GCT ATG AC

Para clonar la secuencia codificante del gen *hPL* en el vector de expresión pNEKhPL1, se utilizaron los cebadores hPL-CUT-F y hPL-CUT-R, que incluyen las secuencias de restricción *NcoI* y *BamHI*. En el caso de la construcción del vector pNEKhPL2, se utilizaron los oligonucleótidos hPL-CUT-F y hPL-R-NS con el fin de introducir las dianas de restricción *NcoI* y *NotI* en la secuencia del gen *hPL*.

Para analizar el carácter transgénico de las plantas regeneradas, se amplificó parte de la secuencia del gen de selección *nptII* mediante los cebadores N1-P1 y N1-P2 específicos para dicho gen.

Los cebadores P35S y T35S se utilizaron para secuenciar los vectores de expresión pNEKhPL1 y pNEKhPL2 y corroborar su correcta construcción.

Los cebadores RT-F y RT-R se utilizaron en los ensayos de PCR en tiempo real, mientras que la secuenciación de fragmentos de DNA (ácido desoxirribonucleico) clonados en el vector pCR2.1 (Invitrogen) se realizó utilizando los cebadores universales M13-F y M13-R.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1.5. Medios de cultivo y soluciones

Las soluciones básicas de laboratorio, así como los medios de cultivo empleados en este trabajo se prepararon según Sambrook *et al.* (1989). En los casos en los que los medios y/o las soluciones fueron más específicos, se prepararon siguiendo las instrucciones y/o protocolos de las casas comerciales. Los productos utilizados para la elaboración de medios de cultivo y soluciones, fueron de las casas comerciales Bio-Rad, Difco, Duchefa, Sigma, Merck, Panreac, Pronadisa y Fluka.

La esterilización de medios y soluciones se realizó mediante autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Los antibióticos y los reactivos termolábiles se esterilizaron mediante filtros de acetato de celulosa de 0,2 μm y fueron añadidos posteriormente a los medios y soluciones.

3.1.6. Reactivos

Todos los antibióticos empleados (ampicilina, estreptomicina, kanamicina y rifampicina) fueron adquiridos en Sigma, excepto la cefotaxima sódica que se compró a Roussel Ibérica, S.A. (Madrid, España).

Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por New England Biolabs. Las enzimas *Thermus aquaticus* YTI (*Taq*) DNA polimerasa y *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) DNA polimerasa necesarias para realizar las amplificaciones mediante PCR fueron suministradas por InvitrogenTM y Promega, respectivamente.

La T4 DNA Ligasa y la *RTg* Superscript III fueron suministradas por Invitrogen.

La proteína hPL comercial fue suministrada por NeoMarkers (Fremont, CA, EE.UU).

El anticuerpo monoclonal MCA332 contra el lactógeno fue suministrado por Serotec y el policlonal RB-9067-P por NeoMarkers. Los anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina anti-conejo y anti-ratón fueron suministrados por SIGMA. El anticuerpo Tetra His conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) se adquirió en Qiagen.

Los agentes gelificantes, como agar bacteriológico y agarosa fueron suministrados por Pronadisa.

Para la determinación del peso molecular de las proteínas se utilizó el marcador de Bio-Rad Precision Plus ProteinTM Standards. Para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA se utilizaron marcadores de BIORON e Invitrogen.

3. MATERIALES Y METODOS

Los reactivos necesarios para hacer los geles de poliacrilamida fueron suministrados por Bio-Rad.

Los reguladores del crecimiento vegetal se adquirieron a Sigma y Duchefa.

Las placas (Maxisorp) para el enzimoimmunoensayo fueron suministradas por Nunc[®].

Las membranas de nitrocelulosa utilizadas en los Western Blot fueron de Bio-Rad. El kit de ECL así como las películas de autoradiografía fueron de Pierce. Los líquidos para revelar las películas fueron de Kodak.

3.2. Métodos

3.2.1. Técnicas básicas de Biología Molecular

Los métodos habituales de manipulación de ácidos nucleicos como digestiones con enzimas de restricción o ligaciones, se realizaron según Sambrook *et al.* (1989) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Otras técnicas básicas empleadas fueron las siguientes:

3.2.1.1. Transformación de bacterias y selección de transformantes

Las células competentes de *E. coli* DH5 α se prepararon según Inoue *et al.* (1990) y se conservaron a -80°C en glicerol. La transformación se llevó a cabo por el método de “choque térmico” (Sambrook *et al.*, 1989), y la selección de las colonias transformantes se realizó a 37°C en medio LB (Tryptona 10 g l⁻¹, NaCl 10 g l⁻¹, Extracto de levadura 5 g l⁻¹, Agar 15 g l⁻¹, pH 7) suplementado con los correspondientes antibióticos de selección.

Las células electrocompetentes de *A. tumefaciens* fueron preparadas según el protocolo descrito por Lin (1995), y conservadas a -80°C. La transformación, se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante del electroporador MicroPulser[™] (Bio-Rad). La selección de las colonias transformadas se realizó en medio YEB (Nutrient Broth (SIGMA N-7519), 5 g l⁻¹, Peptona 5 g l⁻¹, Sacarosa 5 g l⁻¹, Extracto de levadura 1 g l⁻¹, pH 7) suplementado con MgSO₄ 2 mM, rifampicina 50 μ g ml⁻¹ y los correspondientes antibióticos de selección, e incubadas a 28°C durante toda una noche.

Las colonias transformantes fueron analizadas mediante digestión enzimática del DNA plasmídico, o mediante la amplificación del inserto por PCR.

3.2.1.2. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción del DNA plasmídico se utilizaron los kit comerciales Quantum prep® Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad) y Nucleobond® AX Midiprep (Macherey Nagel), dependiendo de la cantidad de DNA necesaria.

La extracción de DNA genómico de plantas se realizó mediante el sistema comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la purificación de DNA, a partir de geles de agarosa o productos de PCR, se utilizó el kit comercial GFX™ PCR (Amersham Biosciences) siguiendo las especificaciones del fabricante.

La extracción de RNA vegetal se realizó a partir de 100 mg de material vegetal homogeneizado con N₂ líquido y siguiendo las instrucciones del kit RNeasy Plant Mini (Qiagen). Las muestras fueron tratadas con DNasa y almacenadas a -80°C hasta su utilización.

3.2.1.3. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizaron dos tipos de enzimas dependiendo de la finalidad de la amplificación. Las amplificaciones del gen *hPL* para las construcciones de los vectores binarios se llevaron a cabo usando la enzima *Pfu* polimerasa (Promega). Las amplificaciones de los genes *hPL* y *nptII* para comprobar el carácter transgénico de las plantas regeneradas se realizaron utilizando la enzima *Taq* polimerasa (Invitrogen).

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Primus 96 Plus (MWG Biotech AG). El DNA molde (10-100 ng) fue mezclado con los correspondientes oligonucleótidos (0.4 μM), los cuatro desoxinucleótidos (dNTP) (0.4 mM), 1 U de polimerasa y el correspondiente tampón de reacción suministrado con la polimerasa, hasta un volumen final de 25 μl. En el caso del uso de la enzima de Invitrogen, la mezcla de PCR se suplementó con MgCl₂ 1.5 mM.

Tras una desnaturalización previa a 95°C, cada uno de los 30 ciclos de la reacción de PCR consistieron en: 1 minuto para la desnaturalización a 94°C, 1 minuto para la hibridación de los oligonucleótidos con el DNA y 1 minuto para la elongación de las cadenas a 72°C. Concluidos todos los ciclos, las muestras se sometieron a 72°C durante 5 minutos para completar la síntesis de las cadenas.

3.2.1.4. Secuenciación

Los fragmentos amplificados por PCR se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación y Genotipado del Servicio General de Genómica de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea. Las reacciones se llevaron a cabo en un secuenciador automático ABIPRISM™, siguiendo las instrucciones del sistema comercial BigDye v3.1 (Applied Biosystems). Este sistema se basa en el método de terminación de cadena de desoxinucleótidos descrito por Sanger *et al.* (1977).

3.2.1.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para la separación de fragmentos de DNA se utilizaron geles horizontales de agarosa a una concentración variable (0.8%-2%), preparados en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y añadiendo bromuro de etidio al 0.05% antes de su polimerización. Las muestras se mezclaron con un tampón compuesto por TAE 5x, glicerol (50%) y azul de bromofenol al 0.005% y se cargaron en el gel al que se le aplicó una corriente de 100 V.

Los fragmentos de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y la concentración se calculó mediante el equipo de documentación de geles Chemidoc (Bio-Rad), utilizando cantidades conocidas de DNA.

3.2.1.6. Electroforesis de RNA en geles de agarosa con formaldehído

Para comprobar la integridad del RNA vegetal extraído se utilizaron geles de agarosa al 1% preparados con tampón MOPS 5x (MOPS 0.1 M pH 7, acetato sódico 40 mM, EDTA 5 mM pH 8) y formaldehído 37%.

Las muestras se cargaron en un tampón que contenía glicerol 50%, EDTA 10 mM pH 8, azul de bromofenol 0.25% y xylene cianol 0.25%, y se migraron a 25 V durante 30 minutos.

Todas las soluciones se prepararon con agua milliQ tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.1%.

Las moléculas de RNA se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.1.7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE)

La separación de proteínas se realizó en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12%, con geles de empaquetamiento al 4%.

Las muestras proteicas se mezclaron en un tampón de disociación (Tris-HCl 250 mM, pH 6.8; SDS 8%; Glicerol 35%; β -mercaptoetanol 2.5%; Azul de bromofenol 0.005%) y posteriormente se desnaturizaron durante 5 minutos a 95°C.

La electroforesis se llevó a cabo en el equipo Mini-protean de Bio-Rad, a 150 V en un tampón compuesto de Tris 25 mM, glicina 192 mM, y SDS 0.1%. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie R-205 al 0.25% en una solución con metanol al 45% y ácido acético al 10%, durante 1 hora. Posteriormente el gel se destiñó en una solución de metanol 10% y ácido acético 7.5%.

3.2.2. Aislamiento y clonación de la secuencia codificante del gen *hPL*

Debido a que el gen *hPL* presenta 5 exones y 4 intrones, se utilizó la metodología RT-PCR para aislar la secuencia codificante. Para ello se partió de mRNA de placenta humana suministrada por Clontech.

La síntesis del DNA complementario (cDNA) se llevó a cabo en un volumen final de 12 μ l en el que se incluyeron 5 μ l de mRNA 1 μ g μ l⁻¹, 1 μ l de oligo dT 500 ng μ l⁻¹ (Invitrogen) y 6 μ l de agua milliQ. La mezcla fue sometida a 70°C durante 10 minutos, tras lo cual se introdujo en hielo durante 5 minutos.

A los 12 μ l se les añadió 4 μ l de un tampón de reacción (5X), 2 μ l de DTT (0.1 M), 1 μ l de dNTP's (10 mM) y 1 μ l de *RTg* SuperScript III. La mezcla se sometió a 42°C durante 52 minutos y posteriormente a 70°C durante 15 minutos.

La PCR se realizó añadiendo a 2 μ l del cDNA sintetizado, dNTP's (0.1 mM), MgCl₂ (1.5 mM), 0.4 μ M de cada uno de los oligonucleótidos específicos (*hPL-F* y *hPL-R*) y 1U de *Pfu* DNA polimerasa por reacción. La mezcla se sometió a una desnaturización previa de 5 minutos y posteriormente a 30 ciclos de 1 minuto 94 °C, 1 minuto a 56 °C y 1 minuto a 72 °C. Finalizado el proceso se alargó un ciclo de 5 minutos a 72 °C para completar las cadenas ya iniciadas.

El producto amplificado se purificó y clonó en el vector pCR[®]2.1 (pCRhPL) que fue introducido en células competentes *E. coli* INVαF' (TA Cloning Kit, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.3. Construcción de los vectores de expresión vegetales

Tras analizar la secuencia amplificada del gen *hPL* y comprobar que no había errores, se procedió a la construcción de los vectores de expresión, empleando los vectores base descritos en el apartado 3.1.3.

Para poder insertar la secuencia codificante del *hPL* en los vectores base de expresión fue necesario modificar los extremos 5' y 3' mediante la introducción de secuencias de restricción. Para ello, mediante PCR y los cebadores descritos en el apartado 3.1.4, se introdujeron las secuencias *NcoI/BamHI* y *NcoI/NotI*.

Tras verificar mediante secuenciación, que la secuencia del *hPL* había sido modificada correctamente en sus extremos, se procedió a la digestión enzimática, tanto de la región codificante como de los vectores base de expresión. Tras purificar los fragmentos digeridos mediante el kit comercial GFX™ PCR (Amersham Biosciences), se procedió a la ligación de los mismos mediante la enzima T4 DNA Ligasa (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de las ligaciones se introdujo en células competentes de *E. coli* tal y como se describe en el apartado 3.2.1.1.

Las construcciones genéticas resultantes (pNEKhPL1 y pNEKhPL2) se chequearon mediante digestión enzimática, y posteriormente fueron secuenciadas utilizando los oligonucleótidos P35S y T35S, tal y como se describe en el apartado 3.2.1.4.

3.2.4. Transformación genética y regeneración de plantas de tabaco

La transformación de *N. tabacum* L. cv Xanthi se realizó mediante el cocultivo de explantos foliares con *A. tumefaciens* siguiendo el protocolo descrito por Horsch *et al.* (1985).

El cultivo bacteriano se preparó inoculando una colonia de cada cepa en 10 ml de medio YEB suplementado con rifampicina 10 mg l⁻¹ y los antibióticos de selección necesarios dependiendo de la cepa empleada (cepa EHA105 con el plásmido pNEKhPL1 y cepa GV3101 con el plásmido pNEKhPL2). Tras dos días de crecimiento, la suspensión bacteriana se empleó para inocular 100 ml de medio YEB al 1% que se cultivaron a 300 rpm y 28°C durante toda la noche, hasta alcanzar una OD₆₀₀ entre 0.5-0.6. El cultivo se centrifugó a 4500 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 4°C, y se resuspendió en 50 ml de medio líquido MS con 2% de sacarosa.

Para la preparación de los explantos de tabaco se seleccionaron hojas bien desarrolladas y verdes, que se seccionaron longitudinalmente a lo largo del nervio central.

3. MATERIALES Y METODOS

Cada mitad se dividió transversalmente en fragmentos de aproximadamente 5x20 mm a los que se les eliminó el peciolo. Los explantos se transfirieron a placas Petri de 90 mm de diámetro conteniendo medio sólido MS con 2% de sacarosa. Como controles se utilizaron explantos no cocultivados con las agrobacterias, que se incubaron en el mismo medio con y sin antibióticos. Se utilizaron 30 explantos por cada experimento de transformación.

El cocultivo se llevó a cabo añadiendo 10 ml de cultivo bacteriano a cada placa e incubándolo durante 20 minutos con agitación ocasional. Tras la incubación, las bacterias se retiraron y los explantos se mantuvieron dos días en oscuridad a 28°C.

Pasado ese tiempo, los explantos se transfirieron al medio T1 (Tabla 4) suplementado con kanamicina 100 mg l⁻¹ y cefotaxima 250 mg l⁻¹ (T1KC) y se cultivaron a 28°C.

Los explantos fueron subcultivados semanalmente a medio fresco T1KC. En estas condiciones se originaron callos, a partir de los cuales se desarrollaron brotes que se transfirieron a medio T2 (Tabla 4) suplementado con kanamicina 100 mg l⁻¹ y cefotaxima 250 mg l⁻¹ (T2KC). Una vez enraizados los brotes se mantuvieron en medio MS con 3% de sacarosa suplementado con kanamicina 100 mg l⁻¹ (MSK) para mantener la presión de selección.

En cada experimento realizado se cuantificó el número de explantos con respuesta. Las observaciones se realizaron a los 30 días de cultivo, sobre un mínimo de 2 experimentos de transformación independientes.

Tabla 4. Medios de cultivo empleados en los procesos de transformación y regeneración de plantas transgénicas de tabaco.

		T1KC	T2KC
Medio base		MS ^a	MS ^a
Reguladores del crecimiento	BAP	0.1 mg l ⁻¹	----
	AIA	0.2 mg l ⁻¹	0.2 mg l ⁻¹
Antibióticos	kanamicina	100 mg l ⁻¹	100 mg l ⁻¹
	cefotaxima	250 mg l ⁻¹	250 mg l ⁻¹

MS^a: 4.4 g l⁻¹ MSMO (Sigma) con 2% sacarosa y solidificado con 0.8% de agar.

3.2.5. Amplificación mediante PCR de los genes *hPL* y *nptII*

Para demostrar el carácter transgénico de las plantas obtenidas, se procedió a la amplificación mediante PCR de los genes *hPL* y *nptII* tal y como se describe en el apartado 3.2.1.3.

La amplificación del gen *nptII* se realizó a una temperatura de hibridación de 56°C, utilizando los oligonucleótidos N1-P1 y N1-P2 (Tabla 3) que amplifican un fragmento de DNA de una longitud de 700 pb.

La amplificación del gen *hPL* se realizó usando los oligonucleótidos *hPL*-F y *hPL*-R a una temperatura de hibridación de 56°C, que amplifican un fragmento de DNA de 654 pb.

3.2.6. Cuantificación de los niveles de transcripción del gen *hPL*

La cuantificación de los transcritos del gen *hPL* se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real, en el laboratorio de Secuenciación y Expresión Génica de la Unidad de Genómica de la Universidad Autónoma de Madrid (Campus de Cantoblanco, Madrid).

La extracción del RNA se realizó tal y como se describe en el apartado 3.2.1.2. El RNA extraído fue cuantificado mediante biofotometría, mientras que la integridad del mismo fue comprobada por electroforesis en geles de agarosa tal y como se describe en el apartado 3.2.1.6.

Las reacciones para la obtención del cDNA fueron llevadas a cabo siguiendo las indicaciones del kit comercial High Capacity cDNA RT (Applied Biosystems). Las amplificaciones se realizaron en un equipo LC480 (Roche), usando la enzima LC480 SYBR Green Master Mix (Roche). Los oligonucleótidos específicos RT-F y RT-R fueron diseñados con el software Primer Express 2.0 y sintetizados por Metabion (Tabla 3). La temperatura de hibridación fue ajustada a 60°C. Como genes internos de referencia se emplearon los genes de las subunidades ribosómicas 16S y 18S de tabaco (Applied Biosystems, Hs99999901_s1 probe). El análisis de los datos se realizó mediante el software LightCycler(R) 480 (Roche).

La cantidad de mRNA del gen *hPL₃* se normalizó frente a la cantidad de mRNA de las subunidades 16S y 18S del RNA ribosómico y se relativizó respecto a una de las muestras, a la que se le asignó el valor transcripcional de 1.

Se analizaron 8 plantas transformadas junto con la planta silvestre, y los callos derivados de las mismas.

3.2.7. Extracción y cuantificación de la proteína hPL recombinante

La extracción de la fracción de proteínas solubles se realizó mediante la homogeneización de 2 discos foliares de 10.8 mm de diámetro en tampón fosfato salino (PBS) (NaCl 0.14 M; KH_2PO_4 1.5 mM; KCl 2.7 mM; Na_2HPO_4 8.1 mM, pH 7.4). La extracción a partir de callos se realizó homogeneizando el tejido con nitrógeno líquido, transfiriéndolo a tubos eppendorf de 1.5 ml hasta la marca de 0.5 ml y resuspendiéndolo en tampón PBS. La extracción de proteínas solubles a partir de las fracciones intracelulares de las suspensiones se realizó mediante la homogeneización mecánica de los pellet frescos en PBS. Posteriormente, todas las muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso.

La cantidad de proteína total soluble (PTS) de las muestras se determinó mediante el reactivo de Bradford, usando albúmina sérica bovina (BSA) como proteína patrón y siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Bio-Rad).

La detección de la proteína recombinante producida se realizó mediante western blot mientras que la cuantificación se llevó a cabo por ensayo inmunoenzimático (ELISA) tipo sándwich.

3.2.7.1. Western blot

La separación electroforética de las proteínas se realizó según lo descrito en el apartado 3.2.1.7.

La transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) se llevó a cabo mediante el sistema semi-seco TransBlot (Bio-Rad), a 25 V durante 50 minutos en tampón Towbin (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol al 20%, pH 8.3). La membrana se bloqueó en PBST (PBS y 0.05% Tween 20) con leche en polvo al 5% (p/v) durante 30 minutos en agitación y a temperatura ambiente. A continuación la membrana se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo específico anti-hPL diluido 1:100 en PBST con leche en polvo. Tras lavar la membrana 3 veces con PBST, se añadió el anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina (dilución 1:2000) durante 1 hora en agitación. Una vez realizados 3 lavados de 5 minutos con PBST y un último con PBS, se añadió el sustrato compuesto por Nitroblue tetrazolio y Bromo-cloro-indol-fosfato en 10 ml de tampón sustrato (Tris 0.1 M, NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, pH 9.5). Tras visualizar las bandas, la membrana se lavó con agua, y se dejó secar en oscuridad.

3. MATERIALES Y METODOS

También se utilizó el sistema ECL de Pierce (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate) para detectar el lactógeno placentario en muestras vegetales. En estos casos las diluciones de los anticuerpos fueron 1:500 para el anticuerpo policlonal anti-hPL y 1:1000 para el anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa (HRP).

3.2.7.2. Enzimoinmunoensayo

El ensayo se realizó en placas de microtitración de 96 pocillos (Maxishorp, Nunc©) según el siguiente protocolo:

- Tapizado de la placa con el anticuerpo policlonal anti-hPL RB9067 diluido 1:500 en PBS. La placa se incubó toda la noche a 4°C.
- Lavado de la placa con tampón PBST dos veces.
- Bloqueo de la placa con PTSC (PBST y 1.5% suero de caballo) a 37°C durante 90 minutos.
- Adición de las muestras y los patrones de hPL. Ambas muestras se añadieron por duplicado, y los patrones se prepararon realizando diluciones seriadas en PBS. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hora.
- Lavado de la placa con PBST 6 veces.
- Adición del anticuerpo monoclonal MCA332 diluido 1:1000 en PTSC e incubación a 37°C durante 90 minutos.
- Lavado de la placa con PBST 6 veces.
- Adición del anticuerpo secundario anti-ratón marcado con fosfatasa alcalina (1:3000) en PTSC, e incubación a 37°C durante 90 minutos.
- Lavado de la placa 5 veces con PBST y una con PBS.
- Adición del sustrato nitrofenilfosfato (Fluka) (1 mg ml^{-1}) en un tampón de dietanolamina al 97%.

3. MATERIALES Y METODOS

La absorbancia de las muestras se midió en un lector Labsystems Multiskan RC a 405 nm de longitud de onda, y el análisis de los resultados se realizó mediante el programa GENESIS Labsystems v. 3.03.

La cantidad de proteína recombinante se calculó a partir de la recta de regresión realizada con cantidades conocidas de la proteína comercial.

Los niveles de hPL recombinante (hPLr) se expresaron como cantidad de proteína producida por μg de PTS.

3.2.8. Purificación de la proteína hPL recombinante

La purificación de la proteína recombinante producida en plantas se llevó a cabo mediante la inmovilización de la misma en una columna de afinidad a ion metálico (Ni^{2+}). Las columnas de polipropileno de 35 ml suministradas por Macherey-Nagel se empaquetaron con 1g de resina Protino Ni-IDA de la misma casa comercial. Ésta es una resina de base silícica con iones de níquel de manera que la proteína recombinante se une a la columna por la afinidad existente entre el níquel y los residuos de histidina.

Se partió de 1 g de tejido foliar fresco homogeneizado con nitrógeno líquido. El polvo resultante se resuspendió en tampón LEW (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8), y se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró con un filtro de acetato de celulosa de 0.45 μm y finalmente se cargó en la columna previamente equilibrada con 8 ml de tampón LEW. El resto del proceso se llevó a cabo tal y como se describe en el manual del fabricante. La elución se realizó en 2 ml de tampón de elución (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8). La fracción eluida se concentró y dializó en tampón PBS mediante una columna Vivaspin (Sartorius).

La proteína concentrada fue liofilizada y almacenada a temperatura ambiente hasta su uso en los ensayos de actividad biológica.

3.2.9. Determinación de la actividad biológica de la proteína hPL recombinante

Los ensayos de actividad biológica se realizaron en colaboración con el grupo de trabajo del Dr. Adolfo García Ocaña y la Dra. Rupangi Vasavada, de la División de Endocrinología y Metabolismo de la Universidad de Pittsburgh (Pennsylvania, EE.UU).

Estos ensayos se dividieron en dos tipos. Por un lado se analizó la capacidad del lactógeno recombinante para activar la ruta celular JAK2/STAT5, y por otro lado se

3. MATERIALES Y METODOS

cuantificó la capacidad de la proteína para inducir proliferación celular. Ambos ensayos se realizaron sobre dos tipos celulares, una línea denominada INS-1 establecida a partir de insulinoma de rata, y células β de islotes pancreáticos humanos.

3.2.9.1. Obtención y mantenimiento de cultivos celulares

Los islotes humanos se obtuvieron del Islet Cell Resource Center. El aislamiento se llevó a cabo por el método de Ricordi (Ricordi y Rastellini, 2000).

La línea celular INS-1 de insulinoma de rata fue cedida por el Dr. D. Stoffers (Universidad de Pennsylvania). Las células se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ en frascos de cultivo (BD Falcon) empleando el medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con glucosa 11 mM, suero fetal de ternera 5%, penicilina 100 U ml⁻¹, estreptomycin 100 μ g ml⁻¹, HEPES 10 mM, L-glutamina 2 mM, sodio piruvato 1 mM, y β -mercaptoetanol 50 μ M. El subcultivo de las células se realizó cada 5 días.

3.2.9.2. Análisis de la activación de la ruta celular JAK2/STAT5

El lactógeno placentario es capaz de unirse al receptor de la PRL y activar la ruta señalizadora JAK2/STAT5. Como consecuencia de ello la molécula STAT5 es fosforilada y translocada al núcleo celular donde se activa la regulación de determinados genes. La detección de la forma fosforilada de STAT5 nos permite determinar la capacidad del lactógeno para unirse al receptor celular.

Los cultivos se realizaron en placas de 6 pocillos hasta una densidad de 10⁶ células por pocillo en medio RPMI-1640 durante 2 días. Posteriormente, se eliminó el medio y se añadió medio fresco sin suero y con glucosa 2 mM, y se incubaron a 37°C durante 5 horas. Tras la incubación se eliminó el medio de cultivo y se añadió tampón Krebs 1x suplementado con glucosa 2 mM y BSA al 1% y las células se cultivaron durante 30 minutos a 37°C. Tras el periodo de incubación se añadieron los péptidos en diferentes concentraciones (50, 100 y 200 ng ml⁻¹ para las células INS-1 y 20 ng ml⁻¹ para los islotes) y se incubaron a 37°C durante otros 30 minutos. Finalmente se eliminó el contenido de los pocillos, se añadió 1 ml de PBS suplementado con aspartato y se congeló la placa a -20°C a la espera del procesamiento de las muestras.

Los extractos proteicos se prepararon en un tampón de lisis frío (SDS 5%, Tris-HCl 80 mmol l⁻¹ pH 6.8, EDTA 5 mmol l⁻¹, PMSF 0.5 mmol l⁻¹), se incubaron durante 30 minutos en

3. MATERIALES Y METODOS

hielo y finalmente se sonicaron. Los restos celulares se separaron del sobrenadante mediante centrifugación, y la concentración de proteínas solubles se midió mediante el kit MicroBCA (Pierce). Un total de 20 µg de proteína se resuspendieron en tampón de disociación, hirvieron durante 5 minutos y se analizaron en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 10%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF que se incubó durante toda la noche a 4°C con diferentes anticuerpos primarios y posteriormente con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa alcalina. La quimioluminiscencia fue detectada mediante el sistema ECL (Amersham Biosciences). Los diferentes anticuerpos primarios empleados fueron α -tubulina (1:2000) (EMD Biosciences/Calbiochem, San Diego, CA), phospho-STAT5 (pSTAT5) (1:1000) y STAT5 (1:2000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA).

Las membranas se limpiaron en una solución compuesta por Tris-HCl 15.6 mM pH 7.0, SDS 2% y 2-mercaptoetanol 100 mM durante 30 minutos a 50°C para probar los diferentes anticuerpos.

Las bandas fueron cuantificadas mediante densitometría con el programa Image J del Instituto Nacional de la salud (NIH) de EE.UU.

3.2.9.3. Ensayos de proliferación celular en la línea INS-1

Las células INS-1 fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con glucosa 11 mM, suero fetal de ternera al 5%, penicilina 100 U ml⁻¹, estreptomicina 100 µg ml⁻¹, HEPES 10 mM, L-glutamina 2 mM, sodio piruvato 1 mM y β -mercaptoetanol 50 µM, hasta una densidad de 2.500 células por pocillo en placas de 96 pocillos (Costar). Tras un día de cultivo en estas condiciones, se retiró el medio y se añadió medio RPMI-1640 fresco con 5% de suero de caballo. A las 24 horas se añadieron diariamente las diferentes concentraciones de péptidos hPL durante 6 días.

El recuento de células se realizó empleando una placa hematocitométrica (Bright Line, Hausser Scientific) previa tripsinización de las mismas. Cada condición se testó por triplicado.

3.2.9.4. Ensayos de proliferación celular en islotes humanos

La proliferación en los islotes humanos se analizó mediante el método de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU). Para este experimento se partió de 70 IE

3. MATERIALES Y METODOS

(equivalentes de islotes) (1 IE=islote de 125 μm de diámetro) por cada condición a analizar. Los islotes se aislaron del cultivo con la ayuda de un microscopio y se lavaron con PBS. Posteriormente se tripsinizaron durante 5 minutos a 37°C y se resuspendieron en medio RPMI-1640.

En placas de 24 pocillos (Costar) se colocaron cubres de cristal de 12 mm de diámetro sobre los cuales se pipetearon 50 μl de islotes (70 IE). La placa se incubó a 37°C durante 2 horas para posibilitar que las células se adhirieran a los cubres. Posteriormente, se añadió 1 ml de medio fresco y las células se incubaron a 37°C durante otras 48 horas.

Tras el periodo de incubación se eliminó el medio de los islotes y se les añadió 1 ml de medio fresco RPMI-1640 suplementado con suero de caballo al 5% y los péptidos hPL (200 ng ml^{-1}). Como control negativo se utilizó un cultivo celular no estimulado con lactógeno. Cada condición se testó por triplicado.

Los péptidos se añadieron a los islotes diariamente durante cuatro días y el último día se añadió BrdU (1:1000) (Amersham proliferation Kit) dejando el cultivo en incubación durante 24 horas más. Finalmente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% y guardadas a 4°C en PBS hasta su tinción.

Para realizar la tinción se eliminó el PBS de cada pocillo y los cubres se colocaron sobre portas. Las células se incubaron con el anticuerpo antiBrdU (1:5) (DNAse I, GE Healthcare) para detectar la replicación celular, con el anticuerpo anti-insulina (1:500) (AbCam) para detectar las células β , y finalmente se añadió el reactivo Hoestch (1:100) (Sigma) para detectar los núcleos celulares. Los cubres se montaron en los portas y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia para hacer el recuento celular.

3.2.10. Estabilidad de la proteína hPL recombinante a lo largo del ciclo vital del tabaco

Uno de los clones pNEKhPL2 fue seleccionado para analizar la estabilidad del lactógeno placentario recombinante a lo largo de tres meses de cultivo en el invernadero. Para ello, tanto las plantas no transformadas como las transgénicas cultivadas *in vitro* se transfirieron al invernadero para ser cultivadas en las condiciones descritas en el apartado 3.1.1. Tras su aclimatación, se tomaron hojas jóvenes mensualmente, se pesaron y se homogeneizaron con nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80°C. Las muestras se resuspendieron en PBS y tras centrifugarlas a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C se obtuvieron los extractos de proteína soluble. La PTS se cuantificó tal y como se describe en el apartado 3.2.7.

3. MATERIALES Y METODOS

Los extractos proteicos se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y tras transferirlos a una membrana de nitrocelulosa se incubaron con anticuerpos anti-hPL tal y como se describe en los apartados 3.2.1.7 y 3.2.7.1.

Los extractos proteicos también se analizaron mediante ELISA para determinar la cantidad de lactógeno placentario, según el protocolo descrito en el apartado 3.2.7.2.

3.2.11. Análisis de la transmisión del transgén hPL a la progenie

Con el fin de analizar la transmisión del gen hPL a la progenie, se obtuvieron semillas de plantas pNEKhPL1 y pNEKhPL2 autofertilizadas. Para ello la zona apical de las plantas se cubrió con una bolsa de papel. Las semillas se secaron en papel de filtro a temperatura ambiente y, posteriormente, se almacenaron en tubos sellados con parafilm a 4°C.

Las semillas se esterilizaron tal y como se describe en el apartado 3.1.1, y se cultivaron en medio MSK. Las semillas germinadas se trasplantaron a recipientes de vidrio de 8 cm de diámetro conteniendo el mismo medio de cultivo, hasta que alcanzaron aproximadamente 5 cm de longitud y se obtuvieron las muestras foliares.

La integridad de la proteína hPLr se analizó mediante western blot y la cantidad se determinó mediante ELISA tal y como se describe en los apartados 3.2.7.1 y 3.2.7.2, respectivamente.

3.2.12. Inducción de callos de tabaco y su análisis morfológico

Para inducir callos de tabaco se cultivaron fragmentos foliares de 18 plantas pNEKhPL1 y 18 plantas pNEKhPL2 cultivadas *in vitro*, en medio de inducción de callo (MIC) suplementado con kanamicina 100 mg l⁻¹ (Tabla 5) durante un mes.

Tras el periodo de incubación los callos formados se subcultivaron mensualmente, en oscuridad y a 23°C, en los medios descritos en la Tabla 5 (MCTA, MCTB, MCTC) y en el propio MIC, todos ellos suplementados con kanamicina 100 mg l⁻¹.

Los callos obtenidos fueron caracterizados tanto a nivel molecular como morfológico.

A nivel molecular, el procesamiento de la proteína, así como su integridad se analizaron mediante western blot, mientras que los niveles de producción se determinaron con la técnica ELISA, tal y como se describe en los apartados 3.2.7.1 y 3.2.7.2 de Métodos.

Morfológicamente, se analizó el tamaño, la textura, y el color de los callos mantenidos en los diferentes medios de cultivo. Para ello se observó el estado de los callos a lo largo de 1

3. MATERIALES Y METODOS

año de subcultivos mensuales. El tamaño de los callos se clasificó en tres categorías: grande (2.5 cm de diámetro o más), mediano (1.5-2.5 cm de diámetro), pequeño (1.5 cm de diámetro o menos). La textura se clasificó en blanda, media y dura, y se anotó el color del tejido. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la media de callos grandes y blandos a lo largo de los subcultivos.

Tabla 5. Medios de cultivo empleados para la inducción y mantenimiento de los callos de tabaco.

		MIC	MCTA	MCTB	MCTC
Medio base		MS	MS	MS	MS
Reguladores del crecimiento	2,4-D	0.2 mg l ⁻¹	--	0.5 mg l ⁻¹	0.2 mg l ⁻¹
	ANA	--	1 mg l ⁻¹	--	--
	BAP	--	--	0.05 mg l ⁻¹	--
	kinetina	--	0.1 mg l ⁻¹	--	0.02 mg l ⁻¹
Antibiótico	kanamicina	100 mg l ⁻¹	100 mg l ⁻¹	100 mg l ⁻¹	100 mg l ⁻¹

MS: 4.4 g l⁻¹ MSMO (Sigma) con 3% de sacarosa y solidificado con 0.8% agar.

3.2.13. Establecimiento y caracterización de suspensiones celulares

Las suspensiones celulares se establecieron transfiriendo 1 callo con aproximadamente 3-4 semanas de cultivo, a matraces de 250 ml con 40 ml de medio de cultivo. El medio líquido fue el mismo que se utilizó para el cultivo de los callos (Tabla 5), excepto en las suspensiones originadas a partir de callos no transformados, en cuyo caso no se añadió kanamicina. Las suspensiones se cultivaron en oscuridad a 150 rpm y 27°C, y tras 2-3 semanas, se transfirieron a matraces de 500 ml en un volumen final de 100 ml. El subcultivo de las suspensiones se realizó cada 10 días, inoculando el medio fresco al 10% (v/v).

A lo largo del cultivo, la evolución de las suspensiones fue caracterizada mediante la determinación de la biomasa, tanto fresca como seca. Para ello se tomaron muestras de 1 ml, aproximadamente, mediante pipetas estériles de 10 ml, y se procesaron utilizando el protocolo descrito por Mills y Lee (1996). Mediante este procedimiento se separó el pellet celular del medio de cultivo, para poder determinar el Peso Fresco (PF). Tras el secado a 65°C durante 24 horas del pellet celular se determinó el Peso Seco (PS).

Por otro lado, se determinó la cantidad de PTS intracelular y extracelular tal y como se describe en el apartado 3.2.7.

3. MATERIALES Y METODOS

Finalmente, se determinaron la integridad y cantidad de proteína hPLr a lo largo del cultivo de las suspensiones. Para ello, tanto las muestras intracelulares (pellet) como el medio de cultivo se analizaron mediante western blot y ELISA, tal y como se describe en los apartados 3.2.7.1 y 3.2.7.2, respectivamente.

La determinación de la actividad proteasa se realizó siguiendo el protocolo descrito por Lee *et al.* (2002).

3.2.14. Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SSPS© v.15. Para estudiar los niveles de hPLr en las diferentes condiciones de cultivo, los datos se analizaron mediante el análisis de la varianza. La normalidad y la homogeneidad de varianzas fueron verificadas mediante los tests de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. La separación de medias se realizó con el test de Duncan ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1. Clonación de la secuencia codificante del gen *hPL*

El primer paso para la obtención de plantas que producen lactógeno placentario humano es la amplificación del gen que codifica dicha hormona, a partir de su fuente natural. Para ello se partió de mRNA comercial (Clontech) de placenta humana, a partir del cual se sintetizó el cDNA tal y como se detalla en el apartado 3.2.2 de Materiales y Métodos. La amplificación de la secuencia codificante del gen *hPL* se obtuvo mediante PCR sobre el cDNA molde empleando los cebadores *hPL-F* y *hPL-R*. Como resultado de la amplificación, se obtuvo un único fragmento de DNA, cuyo tamaño coincidió con el esperado, 654 pb (Figura 2).

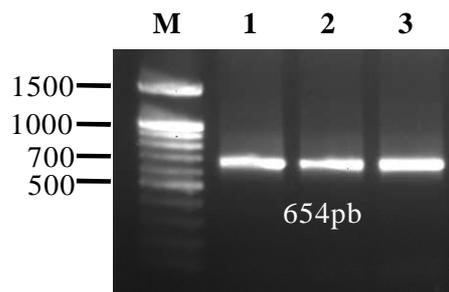


Figura 2. Producto de PCR obtenido de la amplificación del cDNA molde placentario, empleando los cebadores *hPL-F* y *hPL-R*; **M**, marcador de número de pares de bases conocido (pb) (BIORON); **1-3**, producto de PCR de la amplificación correspondiente a los genes *hPL/hGH*.

El fragmento amplificado fue clonado en el vector comercial pCR2.1 (Invitrogen) para proceder a su secuenciación. La secuencia obtenida se analizó mediante el algoritmo BLASTN del NCBI, obteniéndose una homología del 100% respecto a la secuencia codificante del gen *hPL₃* (número de acceso del NCBI NM_020991). El gen amplificado, presentó una diferencia esperable de 4 nucleótidos respecto a la secuencia del gen *hPL₄* (número de acceso del NCBI NM_001317). El fragmento de 654 pb obtenido incluye desde la secuencia iniciadora ATG hasta la señal de terminación TAG (Anexo).

4. RESULTADOS

4.2. Construcción de los vectores de expresión pNEKhPL1 y pNEKhPL2

Una vez obtenida la secuencia codificante del gen *hPL₃* se procedió a la clonación de la misma en los vectores de expresión adecuados para la producción de la proteína recombinante en sistemas vegetales. Para ello, se construyeron dos vectores de expresión, denominados pNEKhPL1 y pNEKhPL2.

Para poder insertar la región codificante del gen *hPL₃* en los vectores de expresión seleccionados fue necesario modificar los extremos 5' y 3' mediante la generación de las secuencias de restricción *NcoI/BamHI* y *NcoI/NotI* mediante PCR. Para ello, se utilizaron los cebadores hPL-CUT-F/hPL-CUT-R y hPL-CUT-F/hPL-R-NS que incluyen dichas secuencias de restricción. El fragmento amplificado fue digerido con las enzimas de restricción citadas anteriormente, al igual que los vectores base. Ambos fragmentos se purificaron a partir del gel de agarosa con el kit Nucleospin (Macherey Nagel) y se ligaron en los vectores base pGJ2750 y pTRAc obteniendo los vectores de expresión pNEKhPL1 y pNEKhPL2, respectivamente.

El vector pNEKhPL1 (Figura 3A) contiene el promotor sencillo 35S CaMV y el terminador del gen *nopalina sintasa*. Como agente de selección contiene el gen *nptII* que confiere resistencia frente a antibióticos aminoglicósidos como la kanamicina.

En el vector pNEKhPL2 (Figura 3B) el gen *hPL₃* se encuentra bajo el control del promotor 2x35S CaMV, un promotor obtenido mediante la duplicación de una secuencia activadora presente en el promotor 35S CaMV. El vector contiene, además, una secuencia KDEL de retención en el RE, que permite que la proteína heteróloga se acumule en el mismo, y la secuencia 5' UTR de la *calcona sintasa* que permite aumentar la eficiencia de la traducción. También posee la secuencia SAR del gen *Rb7* flanqueando el cassette de expresión que interacciona con los andamios nucleares, estructuras que a su vez, se unen a la cromatina facilitando procesos como la replicación y la transcripción. Finalmente, el vector incluye una señal 6xHis para facilitar el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos. Como agente de selección contiene el gen *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina.

4. RESULTADOS

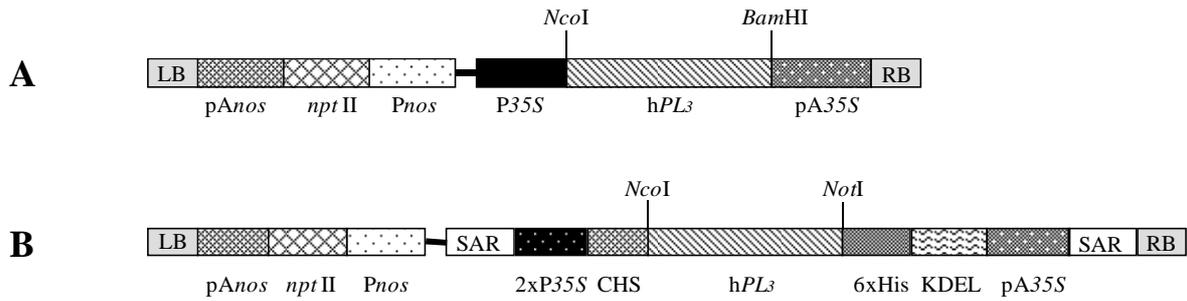


Figura 3. Región T-DNA de los vectores pNEKhPL1 (A) y pNEKhPL2 (B). **pAnos**, terminador del gen *nopalina sintasa*; **nptII** gen *neomicina fosfotransferasa*; **Pnos**, promotor del gen *nopalina sintasa*; **SAR**, secuencia de unión a andamio nuclear del gen *Rb7*; **P35S**, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; **hPL₃**, secuencia codificante del lactógeno placentario humano; **pA35S**, terminador del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor; **2xP35S**, doble promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor; **CHS**, secuencia 5'UTR de la *calcona sintasa*; **6xHis**, cola de histidinas; **KDEL**, secuencia de retención en el retículo endoplasmático; **LB**, borde izquierdo; **RB**, borde derecho.

Tras analizar la integridad de los vectores de expresión, éstos se introdujeron mediante electroporación en *A. tumefaciens*. El vector pNEKhPL1 se introdujo en la cepa EHA105 y el vector pNEKhPL2 en la cepa GV3101. Ambas cepas transformadas se utilizaron en los experimentos de transformación genética.

4.3. Transformación genética y regeneración de plantas transgénicas

La transformación genética vegetal se llevó a cabo mediante el cocultivo de explantos foliares con suspensiones de las cepas de agrobacteria citadas en el apartado anterior. Para ello se siguió el protocolo descrito por Horsch *et al.* (1985).

Los explantos cocultivados se mantuvieron verdes durante las dos primeras semanas de cultivo (Figura 4A). Posteriormente comenzaron a presentar zonas cloróticas y otras zonas verdes en las que aparecieron formaciones callogénicas en las zonas de corte (Figura 4B y 4C). Estos callos también se mantuvieron verdes durante todo el proceso de cultivo hasta que comenzaron a brotar yemas (Figura 4D). Transcurridas 3-4 semanas, las yemas supuestamente transformadas se transfirieron a medio T2 donde enraizaron (Figura 4E). Finalmente, fueron transferidas a medio MSK donde se propagaron mediante subcultivo de yemas apicales. Dichas plántulas, en su mayoría, mostraron un fenotipo similar al de la planta no transformada, con un desarrollo tanto radicular como aéreo normal (Figura 4F y 4G). Uno de los clones pNEKhPL1 presentó diferencias fenotípicas respecto a las plantas no transformadas; tallo más delgado, hojas en forma de roseta en la base, y menor distancia entre los nudos.

4. RESULTADOS

Por el contrario, los tejidos no transformados se necrosaron de la misma forma que los explantos no inoculados y cultivados en presencia de kanamicina 100 mg l^{-1} . Los explantos no inoculados con *A. tumefaciens*, y cultivados en ausencia del antibiótico de selección, se mantuvieron verdes a lo largo del proceso y dieron lugar a un número elevado de yemas (Figura 4H y 4I).

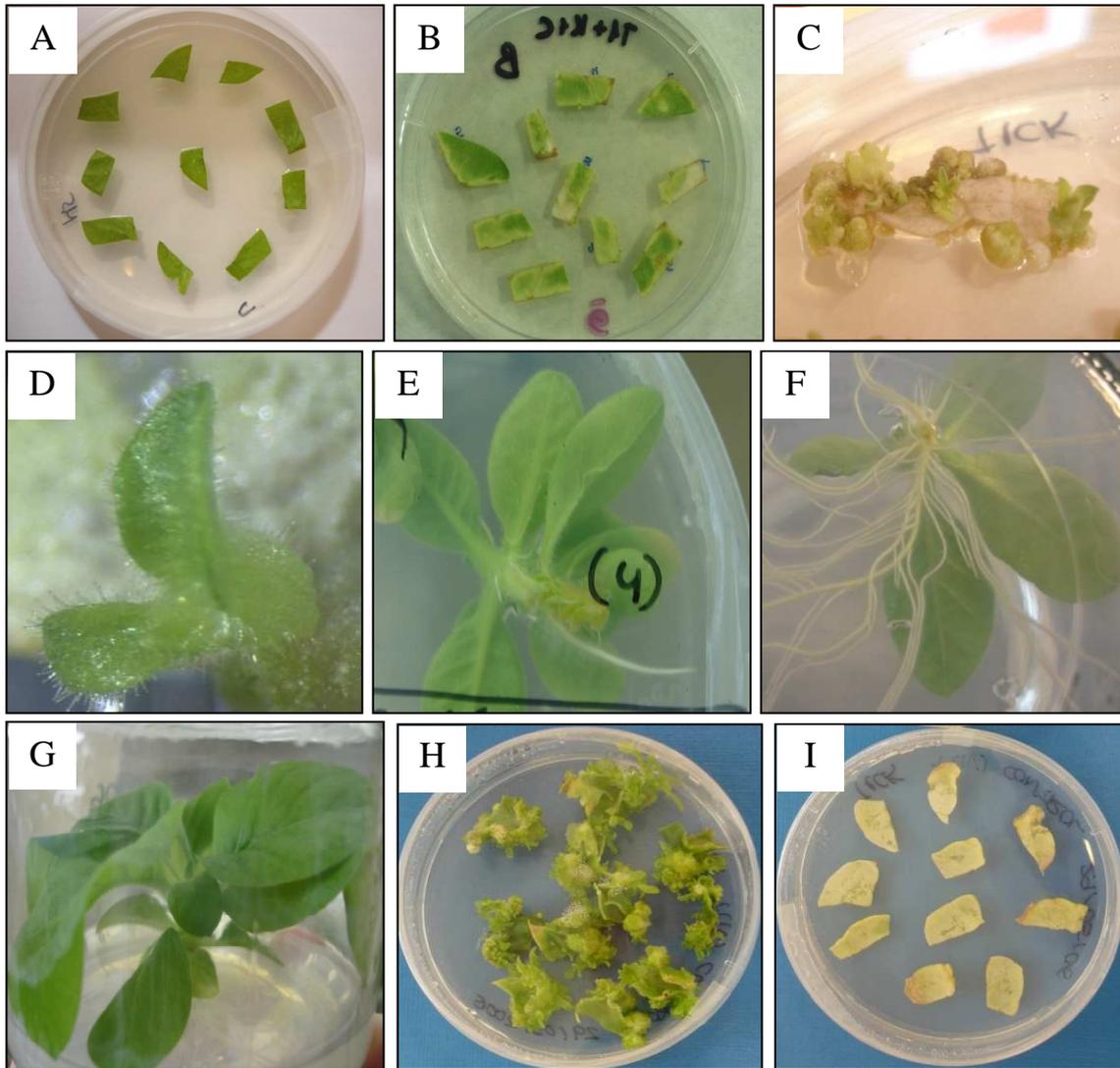


Figura 4. Etapas representativas del proceso de transformación de plantas de tabaco. **A**, explantos foliares en cocultivo con *A. tumefaciens*. **B**, explantos foliares tras 2 semanas de cultivo en medio T1. **C**, desarrollo de callos y yemas. **D**, detalle de una yema. **E**, plántula cultivada en medio T2. **F-G**, Detalle de la raíz y de la parte aérea de una plántula cultivada en medio MSK. **H-I**, controles utilizados en el proceso de transformación, donde los explantos no infectados con *Agrobacterium* son cultivados en ausencia (**H**) y presencia (**I**) de kanamicina.

Con el método de transformación empleado se regeneraron 51 plantas pNEKhPL1 y 21 plantas pNEKhPL2. En ambos casos se realizaron, al menos, 2 experimentos de transformación independientes con un mínimo de 30 explantos foliares. En todos los casos se

4. RESULTADOS

analizó el número de explantos con respuesta a la infección de *A. tumefaciens*. Se observó que en los explantos cocultivados con la cepa EHA105, portadora del vector pNEKhPL1, el 33% de los explantos mostraron respuesta a la infección, generándose yemas que enraizaron en medio MSK. En el caso de las plantas pNEKhPL2, la cepa portadora del vector fue GV3101, en cuyo caso el porcentaje de explantos que generó yemas fue del 14%.

4.4. Detección de los genes *hPL₃* y *nptII* en el genoma de las plantas regeneradas

Una vez obtenidas las plantas potencialmente transgénicas, y enraizadas en medio MSK se procedió a su análisis molecular para verificar la inserción del T-DNA en el genoma. Para ello, se amplificaron mediante PCR los genes *hPL₃* y *nptII* utilizando los cebadores hPL-F/hPL-R y N1-P1/N2-P2, respectivamente.

Como molde se utilizó DNA genómico extraído de las diferentes líneas cultivadas *in vitro*. Como controles positivos de la amplificación se utilizaron los plásmidos pNEKhPL1 y pNEKhPL2, mientras que el DNA extraído de una planta no transformada fue utilizado como control negativo.

La detección de los genes *hPL₃* y *nptII* se realizó en todas las plantas enraizadas en presencia de kanamicina. En la Figura 5 se muestran los resultados de la amplificación de los genes *hPL₃* y *nptII* en algunos clones representativos de cada construcción genética. Los cebadores hPL-F y hPL-R amplificaron un único fragmento de 654 pb, mientras que los cebadores N1-P1/N2-P2 amplificaron un fragmento de 700 pb. En ambos casos el tamaño del fragmento amplificado coincidió con el esperado. Todas las plantas regeneradas resultaron ser positivas para ambos genes.

4. RESULTADOS

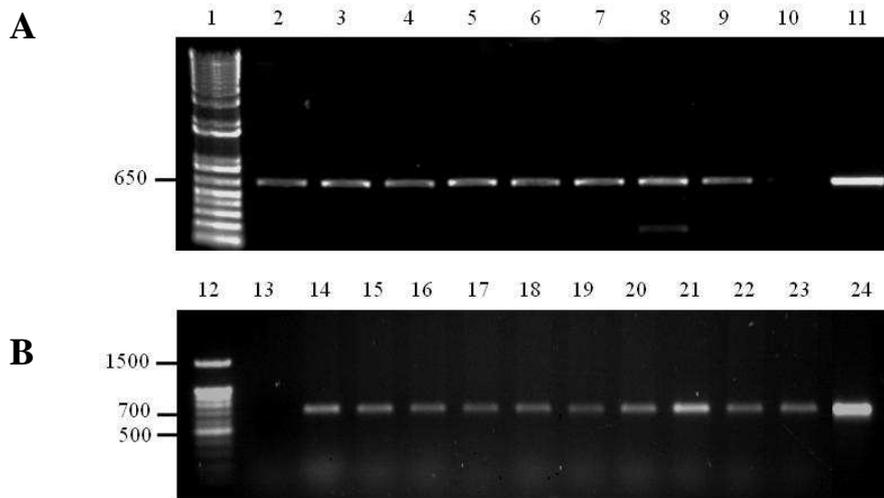


Figura 5. Amplificación de los genes *hPL3* (A) y *nptII* (B) a partir de DNA genómico. **1 y 12**, marcador de pares de bases conocido; **2-9 y 14-23**, plantas cultivadas en presencia de kanamicina; **10 y 13**, controles negativos (DNA de una planta no transformada); **11 y 24**, controles positivos (plásmido pNEKhPL1).

4.5 Análisis de los niveles de transcripción del gen *hPL3* en plantas transgénicas

Tras comprobar la inserción del transgén *hPL3* en el genoma vegetal, se procedió a analizar la actividad transcripcional del mismo. Para ello, se utilizó la técnica PCR en tiempo real sobre el RNA extraído de plantas transgénicas cultivadas en el invernadero. Como control negativo se empleó una planta no transformada.

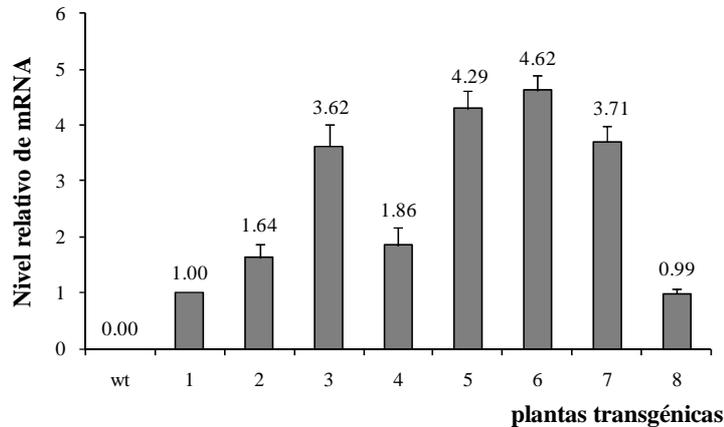
En base a la secuencia del gen *hPL3* clonada en los vectores de expresión, se diseñaron los cebadores RT-F y RT-R descritos en la Tabla 3 de Materiales y Métodos. Estos cebadores permitieron realizar la amplificación de un fragmento de 51 pb.

Todas las plantas transgénicas analizadas mostraron la presencia de transcritos del gen *hPL3*. Los niveles de transcripción variaron entre las líneas transgénicas analizadas. La mitad de los clones mostraron niveles de transcripción 2 veces superiores a los del resto, siendo las líneas 5 y 6, las que mayor actividad transcripcional presentaron (Figura 6A). Los resultados fueron normalizados frente a los niveles del gen endógeno 18S del rRNA y relativizados respecto a la planta 1. La normalización respecto al gen endógeno 16S del rRNA mostró resultados similares a los aquí presentados (datos no mostrados).

En la Figura 6B se indica la cantidad de proteína hPL producida por cada una de las plantas analizadas, como % de hPL sobre la cantidad de PTS. El análisis de regresión mostró que la cantidad relativa de transcritos y la cantidad de hPL se correlacionaban negativamente ($R^2=0.315$). No obstante, al analizar los clones de manera aislada, se observó una correlación positiva en 4 de ellos ($R^2=0.89$).

4. RESULTADOS

A



B

Planta	wt	1	2	3	4	5	6	7	8
hPLr (%)	0	0.69	0.61	0.72	0.75	0.67	0.81	0.64	0.41

Figura 6. A, niveles relativos de mRNA del gen *hPL₃* en distintas plantas transgénicas analizadas mediante PCR en tiempo real. Los niveles se muestran relativizados respecto a la planta 1 y normalizados frente a los niveles de transcritos del gen endógeno 18S. **wt**, planta no transformada; **1-8**, plantas transgénicas analizadas. **B**, niveles de hPLr expresados como porcentaje respecto a la cantidad de PTS. Las cuantificaciones se realizaron mediante ELISA.

4.6. Análisis de la producción de la proteína hPL recombinante en plantas transgénicas

El análisis de la presencia y cantidad de la proteína recombinante sintetizada en las plantas transgénicas se realizó mediante las técnicas western blot y ELISA, respectivamente. Mediante la primera se pretende verificar la integridad de la proteína mediante la determinación de su peso molecular, al mismo tiempo que se determina su capacidad inmunogénica. Mediante la técnica ELISA se cuantifica la cantidad de proteína recombinante producida por los diferentes clones.

Para los análisis western blot se empleó un anticuerpo policlonal anti-hPL sobre los extractos proteicos de plantas. Como control negativo se utilizó el extracto proteico de una planta no transformada.

El resultado del western blot para las plantas pNEKhPL1 mostró la presencia de una banda de 22 kDa que coincide con el peso molecular esperado (Figura 7A).

En el caso de las plantas pNEKhPL2, la proteína recombinante se produce fusionada a una cola de residuos de histidina y contiene una señal de retención endoplasmática KDEL,

4. RESULTADOS

por lo que el peso molecular esperado es de 24 kDa aproximadamente. Como se observa en la Figura 7B, todos los clones analizados mostraron la presencia de una banda mayoritaria de aproximadamente 24 kDa, excepto la planta no transformada. En algunas líneas transgénicas, se detectó una segunda banda de un tamaño ligeramente superior.

También se detectó una banda inespecífica de 37 kDa en todas las muestras analizadas (datos no mostrados), incluyendo el extracto proteico de la planta no transformada.

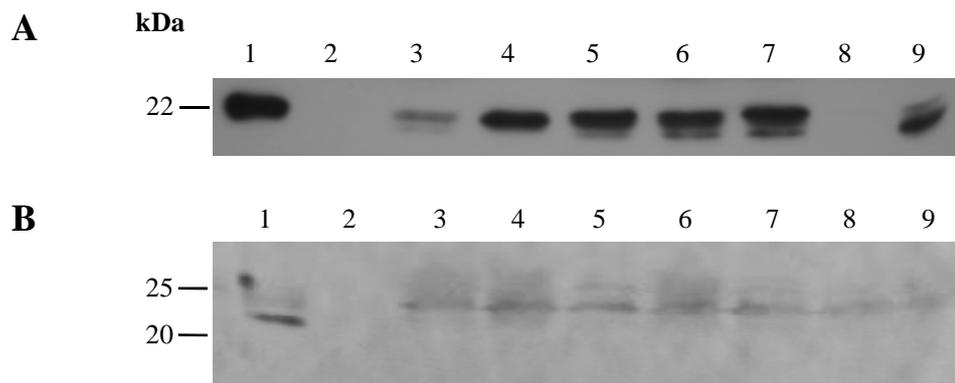


Figura 7. Inmunodetección de la proteína hPLr con un anticuerpo policlonal anti-hPL en plantas transgénicas de tabaco. **A**, plantas pNEKhPL1; **B**, plantas pNEKhPL2. **1**, 20-80 ng de proteína hPL comercial (NeoMarkers); **2**, extracto vegetal de una planta no transformada; **3-9**, extractos vegetales (20 µg) de plantas transgénicas.

La cuantificación de la cantidad de proteína recombinante sintetizada por cada clon se realizó mediante ELISA tipo sándwich tal y como se describe en el apartado 3.2.7.2 de Materiales y Métodos. Para ello se partió de tejido foliar de plantas cultivadas tanto *in vitro* como en el invernadero, de las que se extrajo la PTS. La cantidad de proteína recombinante se normalizó frente a la cantidad de PTS, expresándose como porcentaje de la misma.

Los niveles de expresión entre las diferentes líneas testadas fueron variables, tanto entre las líneas de cada construcción genética, como entre las condiciones de cultivo empleadas (Tabla 6).

4. RESULTADOS

Tabla 6. Cuantificación de la producción de hPL recombinante (hPLr) en plantas transgénicas de tabaco mediante la técnica ELISA. La cantidad de hPLr se expresa como el porcentaje de proteína hPL producida respecto a la cantidad de PTS.

	Construcción genética	Nº de plantas analizadas	Nº de plantas que expresan hPLr	% de hPLr sobre PTS (media)	Rango de expresión (mín.-máx.)
<i>In vitro</i>	pNEKhPL1	31	29	0.066 ^a	0.010-0.186
	pNEKhPL2	18	18	0.507 ^b	0.073-0.839
Invernadero	pNEKhPL1	21	18	0.140 ^a	0.010-0.420
	pNEKhPL2	18	18	0.679 ^c	0.146-1.030

Las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas (p=0.05)

La diferencia en los niveles de expresión entre las plantas pNEKhPL1 y pNEKhPL2 cultivadas en el invernadero fueron estadísticamente significativas, con un nivel 4.8 veces superior en las plantas pNEKhPL2.

El valor medio de proteína sintetizada por las plantas pNEKhPL1 cultivadas *in vitro* fue del 0.066% respecto a la cantidad de PTS, mientras que al cultivarlas en el invernadero el nivel medio se incrementó hasta el 0.140%. Estos datos no mostraron diferencias estadísticamente significativas. En el caso de las plantas pNEKhPL2, el nivel medio de producción en las líneas cultivadas *in vitro* fue del 0.507% de la PTS, mientras que las mismas plantas cultivadas en el invernadero mostraron un nivel medio del 0.679% de la PTS, una diferencia estadísticamente significativa.

Todos los clones pNEKhPL2 analizados expresaban la proteína recombinante, tanto *in vitro* como en el invernadero. Sin embargo, entre las plantas pNEKhPL1 se detectaron clones que no sintetizaban la proteína recombinante pese a tener insertado en su genoma el transgén. Cabe destacar que algunos clones que producían la proteína recombinante cuando se cultivaban *in vitro* no lo hicieron al ser transplantados al invernadero.

4.7. Purificación de la proteína hPL recombinante

Uno de los vectores de expresión empleado, el vector pNEKhPL2, fue diseñado para facilitar la purificación de la proteína recombinante mediante la inserción de 6 residuos de histidina en el extremo carboxilo-terminal de la misma. La cola de histidinas permite purificar la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos. Las fracciones

4. RESULTADOS

del proceso de purificación se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) y western blot.

Tras la separación electroforética de las proteínas, éstas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie (Figura 8A). Como control positivo se emplearon 80 ng de hPL comercial (NeoMarkers), no obstante esta tinción no permitió visualizar dicha cantidad de proteína comercial. Del mismo modo, tampoco se observaron bandas proteicas en las fracciones resultado de la elución, demostrando que la matriz de la columna de afinidad fue altamente específica para las proteínas con cola de histidina.

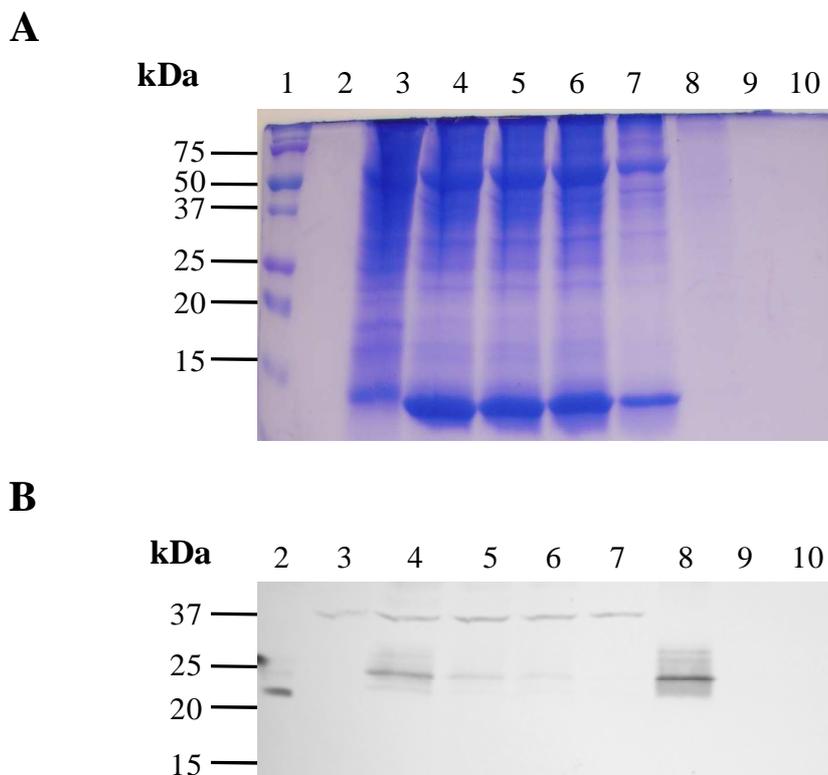


Figura 8. Purificación de la proteína hPL recombinante (hPLr) a partir de tejido foliar de plantas pNEKhPL2 mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos. **A**, electroforesis y tinción con azul de Coomassie de los extractos vegetales; **B**, Inmunodetección del hPLr con el anticuerpo policlonal anti-hPL (NeoMarkers). **1**, marcador de peso molecular (Biorad); **2**, 80 ng de proteína hPL comercial (control positivo); **3**, planta sin transformar (control negativo); **4**, extracto vegetal crudo obtenido de una planta transgénica; **5**, fracción de filtrado obtenida en el proceso de purificación; **6-7**, fracciones de lavado obtenidas en el proceso de purificación; **8-10**, fracciones de elución.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, el revelado del western blot mostró una banda de 24 kDa a lo largo del proceso de purificación que se corresponde con el peso molecular esperado de la proteína sintetizada a partir de la construcción genética pNEKhPL2 (Figura 8B). La proteína observada fue eluida

4. RESULTADOS

completamente en la primera fracción, observándose un enriquecimiento de la misma respecto a la fracción cruda. Paralelamente, también se observó una segunda banda de 37 kDa en todas las muestras analizadas, excepto en las fracciones de elución.

Tras la purificación de la proteína recombinante se procedió a su concentración y se dializó en tampón PBS mediante una columna vivaspin (Sartorius). Una vez concentrada la proteína si fue posible su visualización mediante la tinción con azul de Coomassie (Figura 9A).

La inmunodetección con un anticuerpo policlonal específico contra el lactógeno humano confirmó que la banda más evidente en la electroforesis, se correspondía con la proteína recombinante producida en tabaco (Figura 9B).

Se obtuvieron 2.41 μ g de proteína hPLr por cada gramo de tejido vegetal procesado. La proteína fue liofilizada en frío (4°C) y se almacenó a temperatura ambiente hasta el análisis de su actividad biológica.

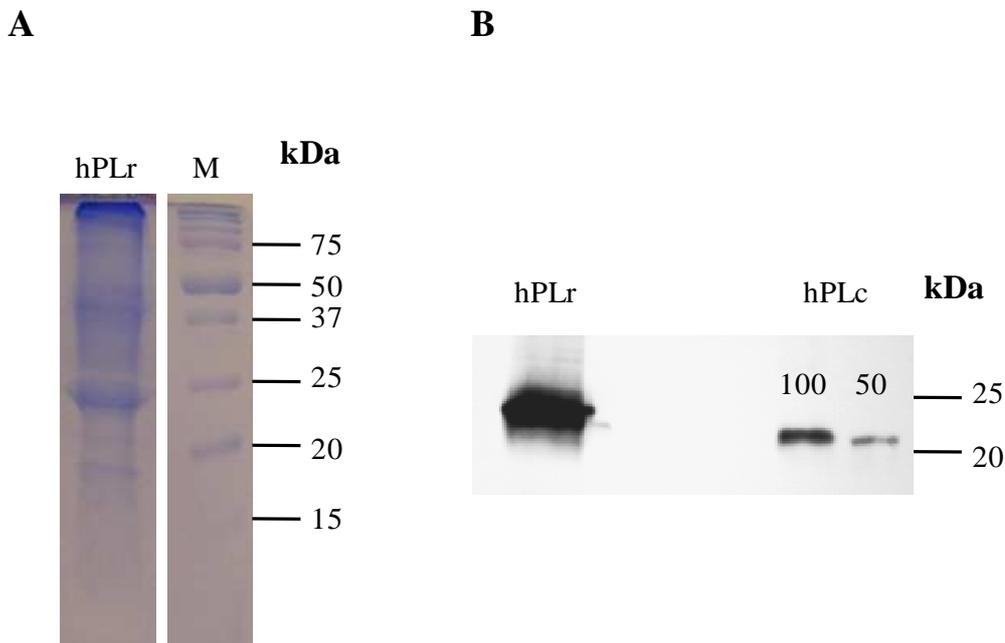


Figura 9. Análisis mediante electroforesis y tinción con Coomassie (**A**), y western blot (**B**) de la proteína hPL recombinante (hPLr) purificada y concentrada. **M**, marcador de peso molecular (Biorad). **hPLr**, lactógeno placentario producido en plantas transgénicas de tabaco pNEKhPL2; **hPLc**, lactógeno placentario humano comercial (NeoMarkers) (50 y 100 ng).

4.8. Análisis de la actividad biológica de la proteína hPL recombinante

La actividad biológica de la proteína hPL producida en las plantas transgénicas de tabaco se determinó mediante la realización de ensayos de señalización intracelular y proliferación celular, tal y como se describe en el apartado 3.2.9 de Materiales y Métodos. Los ensayos se llevaron a cabo en células INS-1 de ratón e islotes humanos.

4.8.1. Ensayos de activación de la ruta señalizadora JAK2/STAT5

El lactógeno placentario humano se une al receptor celular de la prolactina para activar la ruta celular JAK2/STAT5 que activa la progresión del ciclo celular de las células β . La forma fosforilada de la molécula STAT5 (pSTAT5) es translocada al núcleo celular donde se activa la regulación de determinados genes.

Con el fin de analizar la capacidad del hPL recombinante para unirse al receptor celular e iniciar la activación de la ruta señalizadora, se procedió a detectar la molécula pSTAT5 en ambos tipos celulares, células INS-1 y células β de islotes humanos, tratadas con diferentes concentraciones de hPL.

En el caso de los cultivos de células INS-1, la hormona recombinante producida en tabaco fue capaz de inducir la fosforilación de STAT5 en las tres dosis ensayadas, 50, 100 y 200 ng ml⁻¹ de forma similar a la del control positivo suministrado por el NIH (Figura 10A). En las células control, no estimuladas, no se detectó la presencia de pSTAT5.

Para comparar las tasas de fosforilación entre los diferentes péptidos, se determinaron los ratios entre la cantidad de proteína pSTAT5 y el control interno empleado (α -tubulina), expresando los resultados como porcentaje sobre el control. El péptido producido en plantas de tabaco fue capaz de inducir tasas de fosforilación similares a las del hPL suministrado por el NIH (Figura 10B). Esta fosforilación fue dependiente de la dosis empleada.

4. RESULTADOS

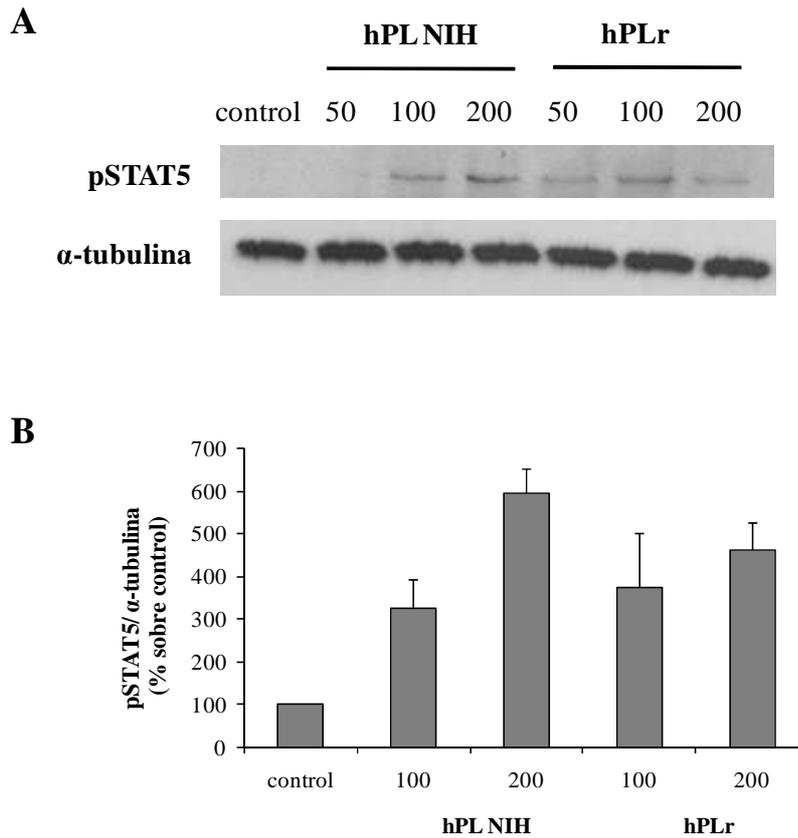


Figura 10. Activación de ruta señalizadora JAK2/STAT5 en células INS-1 mediada por el hPL recombinante (hPLr) producido en plantas de tabaco. **A**, Inmunodetección de pSTAT5 y α -tubulina en las tres dosis ensayadas (50, 100 y 200 ng ml⁻¹). **B**, ratios sobre la cantidad de pSTAT5 y α -tubulina expresados como los valores medios \pm el error estándar de dos experimentos independientes (n=3-4), expresados como porcentaje sobre el control. **control**, células no estimuladas; **hPL NIH**, control positivo suministrado por el NIH; **hPLr**, péptido producido en plantas.

En el caso de los cultivos de islotes humanos, éstos fueron estimulados con 20 ng ml⁻¹ de lactógeno placentario humano. Ambos péptidos empleados fueron capaces de inducir la fosforilación de la molécula STAT5 por encima de los niveles basales del control de células no estimuladas (Figura 11A).

Para poder comparar la capacidad de fosforilación entre los dos péptidos ensayados, se calcularon los ratios de fosforilación normalizándolos respecto a la cantidad de α -tubulina, y se expresaron como el porcentaje sobre el control de células no estimuladas (Figura 11B). Las células estimuladas con los péptidos produjeron 2.7 veces más fosforilación que las células no estimuladas.

Estos resultados confirmarían que también en islotes humanos el lactógeno producido en plantas es reconocido de forma eficiente por el receptor celular de la PRL, demostrando que las plantas son capaces de producir proteínas humanas funcionales y similares a las nativas.

4. RESULTADOS

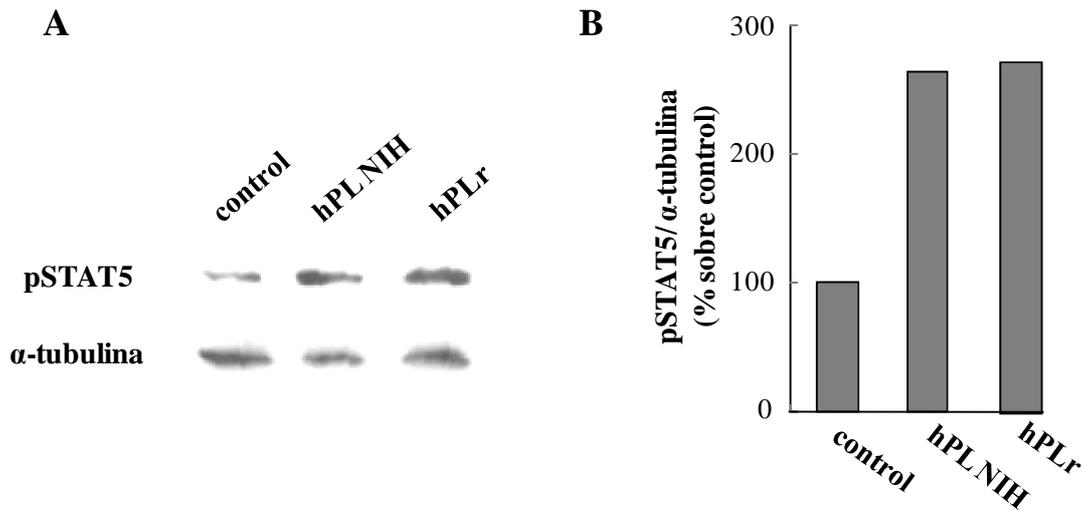


Figura 11. Activación de ruta señalizadora JAK2/STAT5 en islotes humanos mediada por el lactógeno placentario humano recombinante producido en plantas de tabaco. **A**, inmunodetección de pSTAT5 y α -tubulina, en células tratadas con 20 ng ml^{-1} de péptidos hPL. **B**, ratios de la cantidad de pSTAT5 y α -tubulina expresados como porcentaje sobre el control. **control**, células no estimuladas; **hPL NIH**, control positivo suministrado por el NIH; **hPLr**, lactógeno placentario producido en plantas transgénicas de tabaco.

4.8.2. Ensayos de Proliferación celular

Uno de los cambios más notables que sufren las células β pancreáticas durante el embarazo, como consecuencia de la secreción de hPL, es el aumento de la división celular. Esta capacidad mitogénica del hPL es una característica muy importante que permite aumentar la proliferación de las células β para incrementar su masa.

La capacidad mitogénica del hPL se determinó en ambos tipos celulares, línea INS-1 e islotes humanos, mediante el recuento celular de cultivos incubados con los péptidos hPL.

Las células INS-1 fueron contabilizadas durante 6 días de cultivo en presencia de diferentes concentraciones de hPL (50, 100, 200 ng ml^{-1}). Como controles negativos se utilizaron cultivos celulares no estimulados y cultivos tratados con el extracto vegetal purificado de una planta no transformada (wt). Como se observa en la Figura 12, el lactógeno producido por las plantas de tabaco fue capaz de inducir la proliferación de las células INS-1, de forma similar al hPL suministrado por el NIH (control positivo).

El extracto vegetal no transformado no fue capaz de inducir proliferación en las células INS-1 por encima del crecimiento basal, demostrando que la estimulación estaba específicamente mediada por el péptido producido en plantas.

4. RESULTADOS

En general, las diferencias entre condiciones fueron más claras a partir del 4° día de cultivo, llegando a ser máximas al 6° día.

Con la dosis más baja empleada, 50 ng ml^{-1} , las diferencias más importantes se detectaron al 4° día entre el control positivo y el resto de tratamientos (Figura 12D). Al final del periodo de cultivo, los recuentos celulares de las muestras tratadas con los péptidos hPL disminuyen hasta niveles similares a los detectados en los controles no estimulados (Figura 12A).

Al aumentar la dosis de hPL se observó que los recuentos celulares aumentaron notablemente entre las células tratadas con péptidos y las no tratadas. Con la dosis de 100 ng ml^{-1} de péptido, se obtuvieron recuentos de 27.166 ± 1.200 y 29.166 ± 4.300 células frente a 14.900 ± 3.900 y 16.900 ± 3.000 células en los controles (Figuras 12B y 12E). Esto supuso un aumento de la proliferación celular del 76% entre los cultivos tratados con hPL y los no tratados.

Con la dosis más alta testada, 200 ng ml^{-1} (Figuras 12C y 12F), se obtuvieron las diferencias más importantes, tanto entre cultivos tratados y no tratados, como entre el hPL producido en plantas y el suministrado por el NIH. En las células tratadas con hPL la proliferación celular fue un 131% superior a las células control, mientras que el hPL producido en plantas fue capaz de aumentar la proliferación un 40% respecto al hPL suministrado por el NIH.

4. RESULTADOS

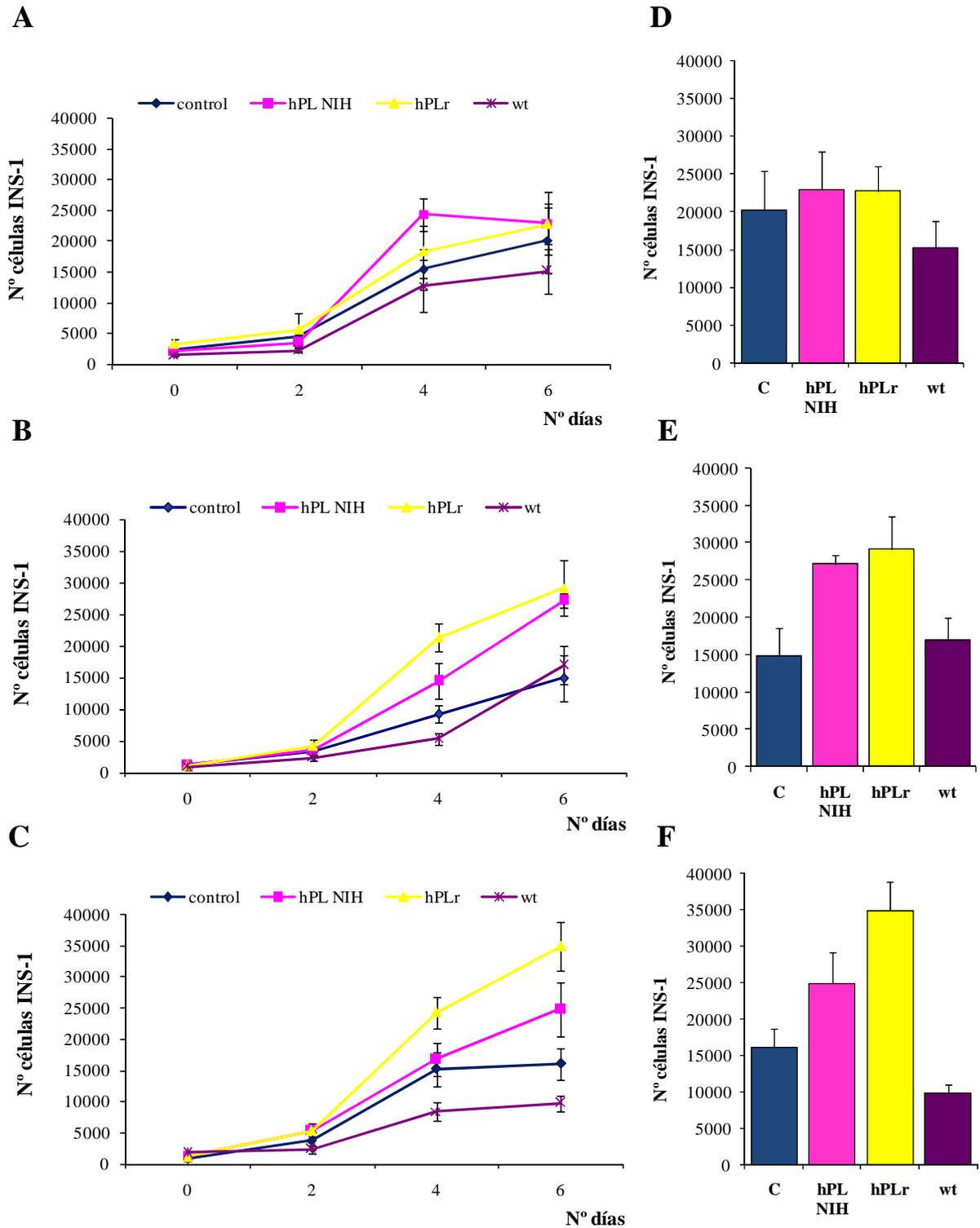


Figura 12. Proliferación de células INS-1 en respuesta a diferentes concentraciones de hPL. **A**, 50 ng ml⁻¹; **B**, 100 ng ml⁻¹; **C**, 200 ng ml⁻¹. **D**, **E** y **F**, Recuentos celulares al 6º día de cultivo, con las tres dosis testadas de 50, 100 y 200 ng ml⁻¹, respectivamente. **control** (C), células no estimuladas; **hPL NIH**, células tratadas con el control positivo de hPL suministrado por el NIH; **hPLr**, células tratadas con la proteína hPL producida en plantas transgénicas de tabaco; **wt**, células tratadas con el extracto vegetal de una planta de tabaco no transformada.

4. RESULTADOS

Con el fin de corroborar los resultados anteriores en un entorno genético humano, se analizó la capacidad mitogénica del péptido producido por plantas en cultivos de islotes pancreáticos humanos. Estos ensayos de proliferación de células β humanas se realizaron mediante el método de incorporación de BrdU tal y como se describe en el apartado 3.2.9.4. Los cultivos celulares fueron estimulados con 200 ng ml^{-1} de hPL y tras las tinciones de BrdU e insulina se contabilizó el número de células β proliferantes. Los resultados mostraron que la proliferación inducida por el hPL producido en plantas era similar al inducido por el control suministrado por el NIH. (Figura 13). Ambos péptidos fueron capaces de aumentar la proliferación celular en un 75% respecto al control, en el que las células no habían sido estimuladas.

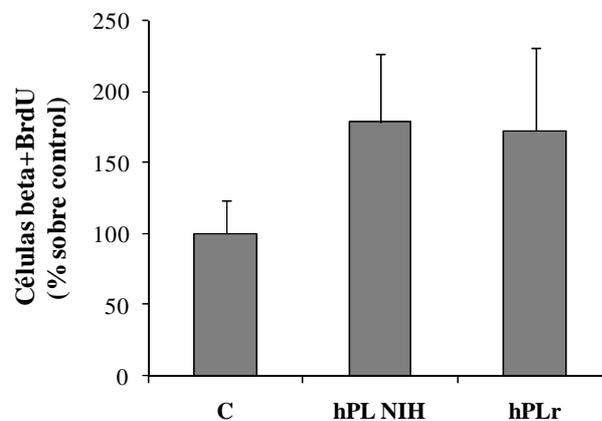


Figura 13. Proliferación de células β humanas tras su estimulación con 200 ng ml^{-1} de hPL. Los resultados se muestran como porcentajes respecto al control, representando las medias \pm error estándar. **C**, control de células no estimuladas (n=7); **hPL NIH**, control positivo suministrado por el NIH (n=9); **hPLr**, péptido producido en plantas transgénicas de tabaco (n=3).

4.9. Estabilidad de la proteína hPL recombinante a lo largo del ciclo vital del tabaco

Con el fin de investigar la distribución temporal de la producción de hPLr en plantas de tabaco, así como de determinar la influencia del estado fisiológico de las mismas sobre la producción, se analizó la cantidad e integridad de la proteína recombinante a lo largo de tres meses de cultivo de una línea pNEKhPL2 en el invernadero.

Tanto las plantas no transformadas como las transgénicas mostraron un crecimiento similar a lo largo del periodo de cultivo. La floración se produjo entre los 47-50 días, mientras que la maduración de los frutos se observó después de los 60 días.

4. RESULTADOS

Hacia el final del cultivo, las plantas, de aproximadamente 1 m de altura, mostraban hojas con síntomas de clorosis en la zona apical y media, mientras que las hojas basales estaban necróticas y sin turgencia (Figura 14). La producción de semillas también fue similar, tanto en cantidad como en morfología.

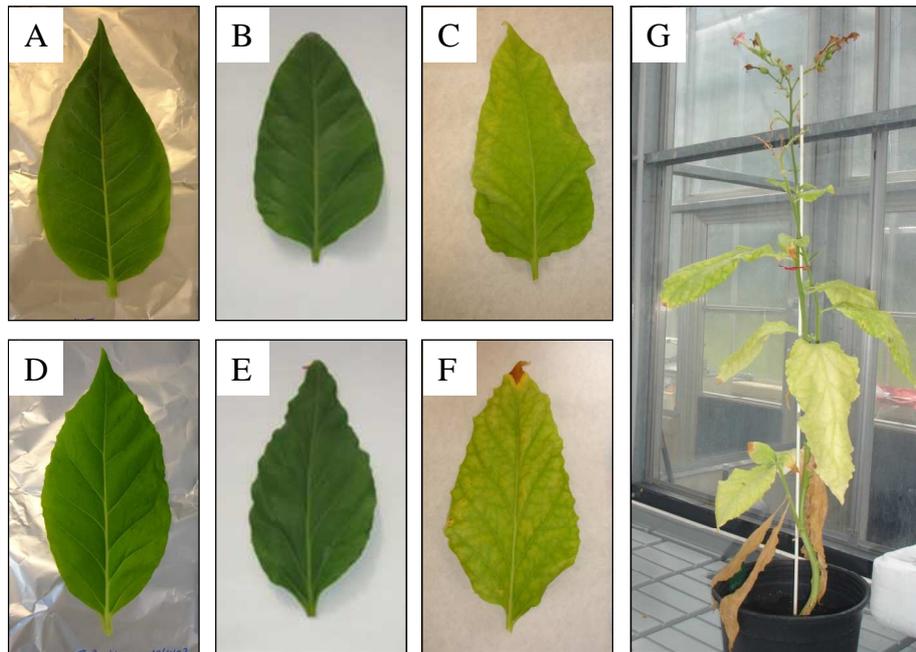


Figura 14. Morfología de las hojas apicales de plantas de tabaco transgénicas y no transformadas cultivadas en el invernadero. **A-C**, hojas de plantas no transformadas a los 30, 60 y 90 días; **D-F**, hojas de plantas transgénicas a los 30, 60 y 90 días; **G**, aspecto de la planta no transformada tras 90 días de cultivo.

La evolución de la PTS en las hojas apicales fue similar tanto en las plantas transgénicas como en las no transformadas. Durante los dos primeros meses la PTS se mantuvo constante, para disminuir en un 46% al final del periodo de cultivo.

La cantidad de hPLr se determinó mediante ELISA y fue normalizada frente al peso fresco de cada muestra foliar. Como se observa en la Figura 15A, la cantidad de hPLr se redujo en un 26% en las hojas apicales al final del periodo de cultivo.

Cabe destacar que ni la floración ni la aparición de los frutos tuvieron un impacto aparente sobre la acumulación de la proteína recombinante, ya que la cuantificación de la misma mostró resultados similares antes y después de dichos procesos.

4. RESULTADOS

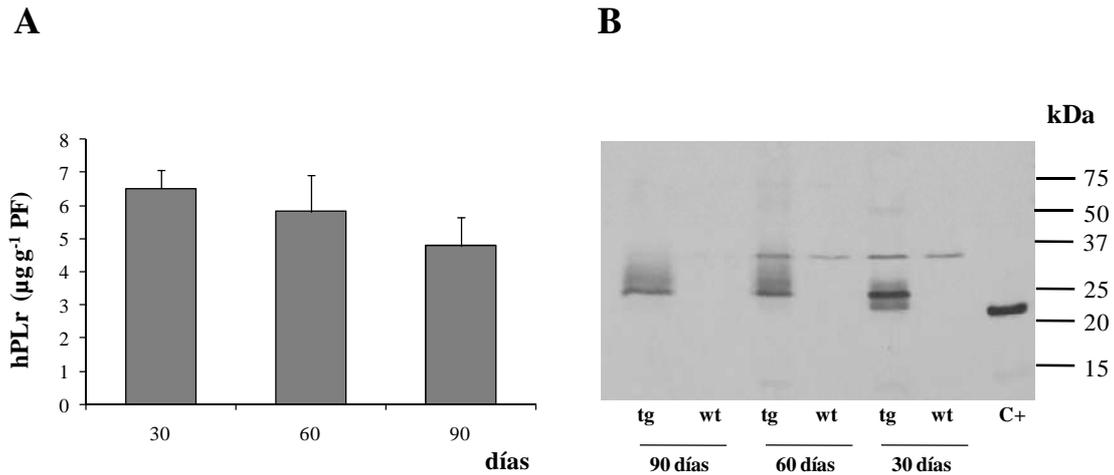


Figura 15. Evolución de la cantidad de hPL recombinante (hPLr) en las plantas de tabaco cultivadas en el invernadero durante 90 días. **A**, cuantificación mediante ELISA de la cantidad de hPLr a lo largo del periodo de cultivo. Los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. **B**, western blot representativo de la detección del hPLr durante el periodo de cultivo de las plantas de tabaco. **C+**, 80 ng de hPL comercial (NeoMarkers); **wt**, extracto vegetal de plantas no transformadas; **tg**, extracto vegetal de las plantas transgénicas (40 μg de PTS).

La detección inmunoenzimática de la proteína recombinante a lo largo del periodo de cultivo del tabaco permitió determinar que la proteína se procesaba correctamente y que no sufría degradación (Figura 15B). La proteína recombinante mostró el peso molecular esperado (24 kDa), mientras que en los extractos vegetales de las plantas no transformadas no se detectó ninguna proteína de ese tamaño. En cambio, si se observó una banda inespecífica de 37 kDa que aparecía en todas las muestras analizadas.

4.10. Transmisión del carácter transgénico y producción de la proteína hPL recombinante en plantas de la progenie

Todas las plantas transgénicas de tabaco obtenidas, excepto uno de los clones pNEKhPL1, fueron fértiles y produjeron semillas y frutos en número y color similar al de las plantas no transformadas (Figuras 16A y 16C). Las flores también mostraron la morfología típica de la variedad, con su forma tubular y corola de color rosa (Figura 16B).

El clon pNEKhPL1 que no mostró las mismas características morfológicas que el resto, tenía flores más pequeñas, y con anteras más cortas que no alcanzaban el estigma. La planta no desarrolló ni frutos ni semillas (Figuras 16D y 16E).

4. RESULTADOS

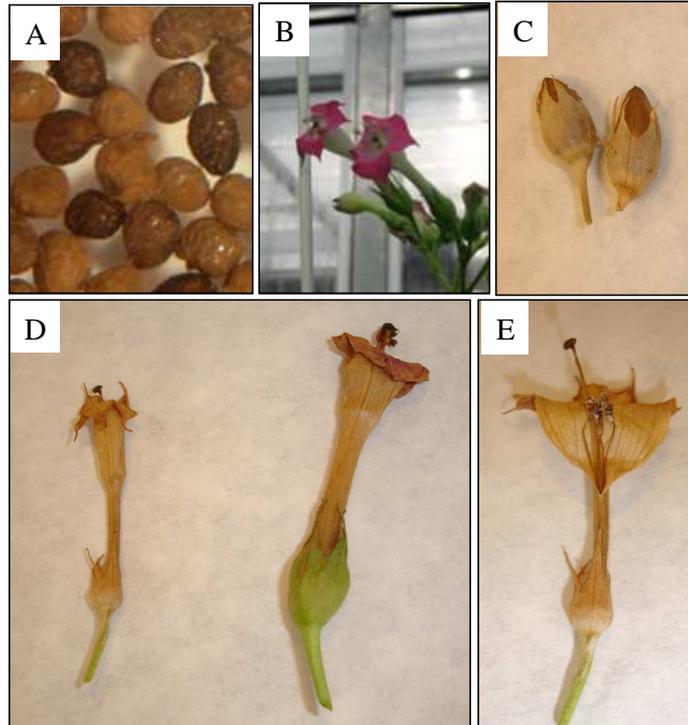


Figura 16. Morfología de semillas y flores de plantas de tabaco transgénicas y no transformadas. **A-C**, semillas, flores y frutos de una planta transgénica, respectivamente; **D**, flor del clon transgénico (izquierda) no fértil junto a la de la planta no transformada (derecha); **E**, detalle del clon transgénico no fértil.

Con el fin de comprobar la estabilidad del transgén a través de las generaciones sexuales, se analizó la transmisión del carácter transgénico en la progenie de líneas transgénicas pNEKhPL1 y pNEKhPL2. Para ello, se investigó la transmisión del gen *nptII* mediante la germinación de semillas autofecundadas en medio MSK. Se eligieron 2 líneas transgénicas, una de entre las plantas pNEKhPL1 y otra de entre las plantas pNEKhPL2.

Las semillas de las plantas transgénicas y las plantas no transformadas fueron cultivadas durante 30 días en el medio de selección MSK. Tras este periodo de cultivo tanto las semillas sensibles como las resistentes al antibiótico fueron capaces de germinar, pero sólo aquellas que habían conservado el gen de resistencia continuaron creciendo (Figura 17A). A los pocos días de su germinación, las plántulas de la planta no transformada, así como las de las plantas transgénicas que no conservaron el gen de selección, mostraron un aspecto clorótico, volviéndose totalmente blancas y muriendo finalmente (Figura 17B). En la planta pNEKhPL1 se analizaron 120 semillas, de las cuales el 66% fueron resistentes y el resto sensibles. En el caso de la línea transgénica pNEKhPL2, se analizaron 218 semillas, de las cuales el 90% fueron resistentes al antibiótico de selección, mientras que el 10% restante

4. RESULTADOS

fueron sensibles. Todas las semillas de la planta no transformada fueron sensibles al antibiótico.

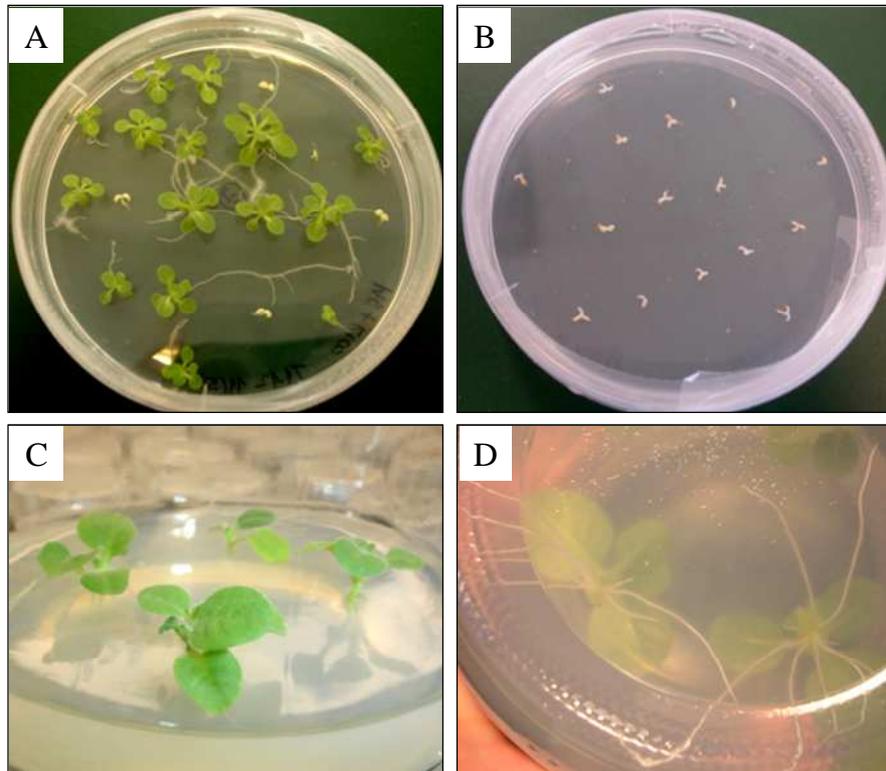


Figura 17. Germinación de semillas y desarrollo de plantas de la progenie (pNEKhPL2). **A**, semillas transgénicas germinadas en medio MSK; **B**, semillas no transgénicas germinadas en MSK; **C** y **D**, desarrollo aéreo y radicular de plantas transgénicas pNEKhPL2 de la progenie cultivadas en MSK.

El análisis de la cantidad e integridad de la proteína recombinante se realizó sobre 30 plántulas pNEKhPL2 que fueron transferidas a recipientes de vidrio de 8 cm de diámetro, donde fueron cultivadas durante 2-3 semanas en el medio de cultivo selectivo MSK. Las plántulas resistentes mostraron un crecimiento normal, tanto a nivel foliar como radicular (Figuras 17C y 17D). Cuando las plantas cultivadas *in vitro* alcanzaron aproximadamente 5 cm de longitud, se extrajeron las muestras de PTS tal y como se describe en la sección 3.2.7 de Materiales y Métodos.

El análisis western blot realizado sobre los extractos proteicos de la progenie mostró la presencia de una banda mayoritaria con un peso molecular que coincide con el esperado (24 kDa) (Figura 18). Como en otras inmunotinciones, también se detectó una banda inespecífica de 37 kDa que aparecía en todas las muestras analizadas, incluida la planta no transformada.

4. RESULTADOS

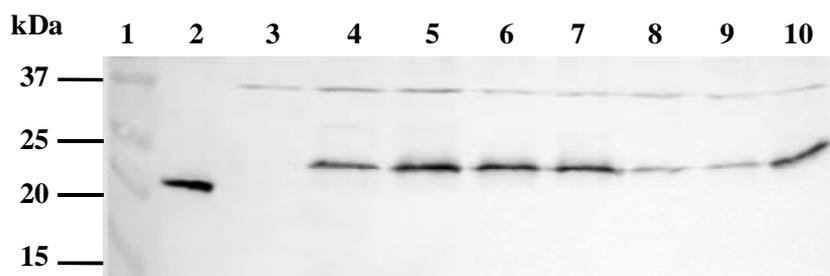


Figura 18. Inmunodetección del hPL recombinante en plantas de la progenie utilizando un anticuerpo policlonal anti-hPL. **1**, marcador de peso molecular (Bio-rad); **2**, 100 ng de la proteína hPL comercial (NeoMarkers); **3**, extracto vegetal de una planta no transformada; **4-10**, extractos proteicos (20 μ g) de plantas transgénicas de la progenie.

La cuantificación de la cantidad de hPL producido en plantas se realizó mediante ELISA. Todas las plantas de la progenie analizadas mostraron elevados niveles de producción, con valores que variaron entre el 0.3% y el 1.1% respecto a la PTS. El nivel medio de producción de la proteína hPLr fue del 0.7%.

Los niveles de hPL mostrados por las plantas de la progenie fueron superiores tanto a los de las plantas pNEKhPL2, como al de la propia planta parental, cuyo nivel de expresión fue del 0.45% de la PTS. El nivel medio de producción en la progenie fue 1.5 y 1.4 veces superior al de la planta parental y el conjunto de las plantas pNEKhPL2, respectivamente.

4.11. Inducción de callos a partir de tejido foliar de plantas transgénicas

Una vez analizada la expresión de la proteína hPLr en las plantas transgénicas de tabaco, se estudió la producción de esta proteína en un sistema vegetal alternativo, las suspensiones celulares. El cultivo de células en suspensión posibilita la liberación de la proteína recombinante al medio de cultivo, facilitando el proceso de purificación y permitiendo el crecimiento de las células transformadas en un sistema cerrado y controlado.

El establecimiento de suspensiones celulares transgénicas se puede iniciar a partir de tejido foliar de plantas transgénicas, mediante la inducción de callos o grupos de células indiferenciadas. Para ello, los fragmentos foliares son cultivados en medios de cultivo suplementados con reguladores del crecimiento vegetal.

Tras 2-3 semanas de cultivo en medio de inducción de callo (MIC, medio MS suplementado con 0.2 mg l⁻¹ de 2,4-D) los explantos foliares comenzaron a mostrar pequeños callos en proliferación en las zonas de corte. Estos callos eran de dos tipos, algunos blancos y compactos y otros más oscuros, grandes y blandos (Figuras 19A y 19B). Los callos de aspecto más blando se transfirieron a diferentes medios de cultivo para su mantenimiento. Tras los

4. RESULTADOS

primeros subcultivos en los 4 medios ensayados, se observó que los callos cultivados en los medios MCTB (MS suplementado con 2,4-D 0.5 mg l⁻¹ y BAP 0.05 mg l⁻¹) y MIC no proliferaban en la misma medida en que lo hacían los cultivados en los medios MCTA (MS suplementado con ANA 1 mg l⁻¹ y kinetina 0.1 mg l⁻¹) y MCTC (MS suplementado con 2,4-D 0.2 mg l⁻¹ y kinetina 0.02 mg l⁻¹). Su fenotipo también fue diferente, con un color más oscuro y el endurecimiento de la masa celular (Figuras 19C3-C4 y 19D3-D4). Por el contrario, los callos cultivados en los medios MCTA y MCTC proliferaron notablemente formando callos viables que fueron subcultivados cada 3-4 semanas (Figuras 19C1-C2 y 19D1-D2).

Se observó que el color de los callos, aunque varió a lo largo del tiempo, fue similar en ambos tipos, con una ligera tendencia hacia el color blanco en los callos cultivados en el medio MCTA y hacia el amarillo claro en los callos cultivados en el medio MCTC (Figuras 19C y 19D).

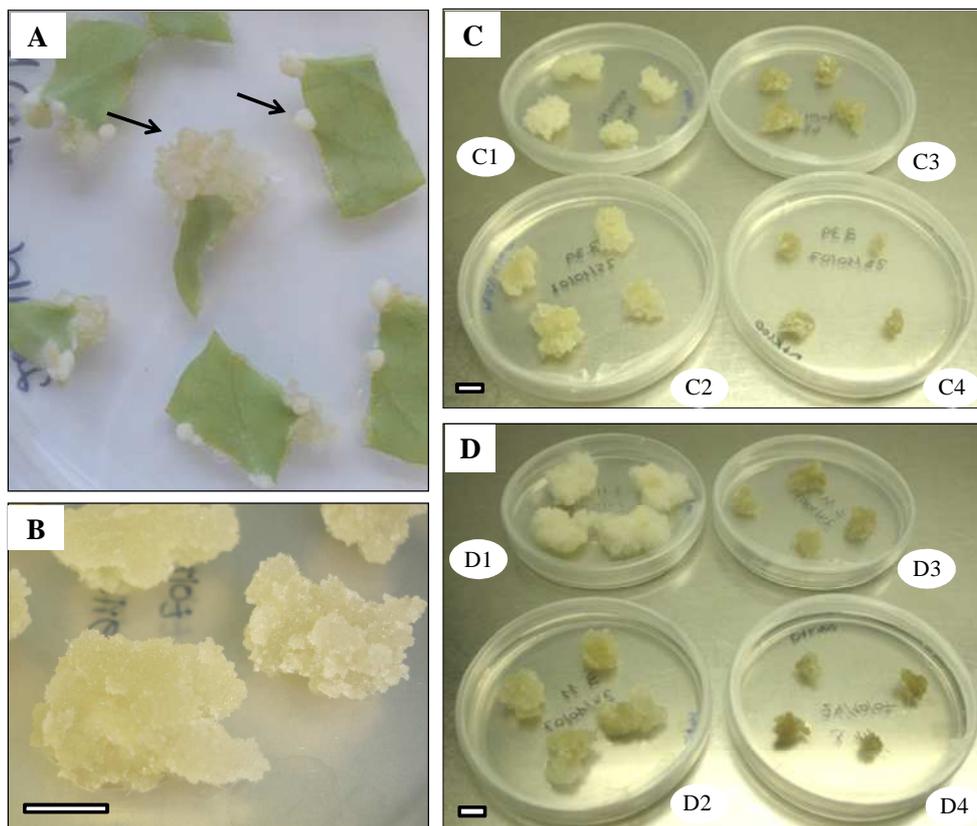


Figura 19. Inducción de callos a partir de tejido foliar de plantas transgénicas de tabaco y desarrollo de los mismos en diferentes medios de cultivo. **A**, explantos foliares cultivados durante 3 semanas en medio de inducción; **B**, callos aislados de los explantos y cultivados en medio de inducción; **C** y **D**, efecto de los diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo y morfología de algunas líneas de callos aislados. **C1** y **D1**, callos en MCTA; **C2** y **D2**, callos en MCTC; **C3** y **D3**, callos en MCTB; **C4** y **D4**, callos en MIC. Las flechas indican los callos blandos y compactos.

4. RESULTADOS

El análisis del tamaño de los callos reveló que el 65.52% de los callos cultivados en el medio MCTA tenían un tamaño clasificado como grande (2.5 cm de diámetro o más), mientras que la textura blanda solo se observó en el 30.59% de los callos cultivados en este medio. Respecto a los callos cultivados en el medio MCTC, se observó que el 27.19% de los callos eran de tamaño grande, mientras que el 62.14% de los callos analizados mostraron una textura blanda.

Las características de tamaño y textura se mantuvieron constantes a lo largo de 1 año de subcultivos mensuales.

4.11.1. Análisis de los niveles de transcripción del gen *hPL₃* en callos transgénicos

Con el fin de corroborar la correcta expresión del transgén en callos transgénicos y así poder determinar el grado de correlación entre los niveles de expresión en plantas y en callos, se procedió a analizar la cantidad de transcritos del gen *hPL₃* en los callos obtenidos a partir de las plantas analizadas previamente.

La cuantificación de los transcritos del gen *hPL₃* se realizó mediante PCR en tiempo real, sobre el RNA extraído de los callos transgénicos cultivados en el medio MCTA, por ser los que mayor proliferación mostraron. Como control negativo se utilizó el RNA del callo originado a partir de una planta no transformada. Los niveles de mRNA se normalizaron frente a la cantidad de transcritos del gen endógeno 18S del rRNA y fueron relativizados respecto al nivel de expresión de la línea transgénica 1.

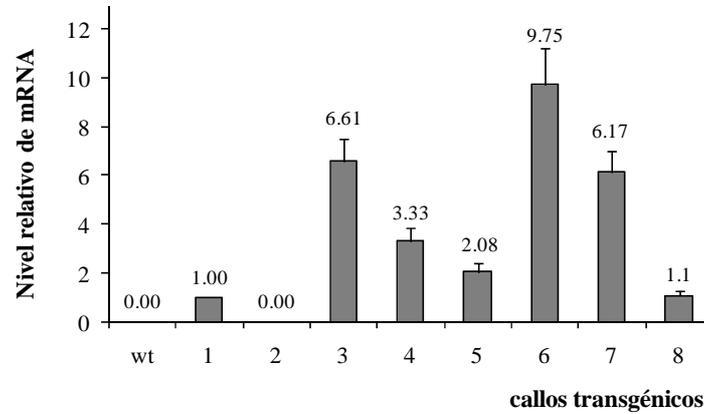
Todos los callos analizados, con una excepción, mostraron niveles detectables de mRNA del gen *hPL₃* (Figura 20A). El callo que no presentó transcritos del gen *hPL₃* se corresponde con el que no presentó niveles detectables de proteína hPLr.

Los niveles de expresión fueron variables entre los diferentes clones analizados. El clon con mayor nivel de expresión mostró 9.7 veces más cantidad de transcritos que el clon con menor expresión. La normalización respecto al gen endógeno 16S del rRNA mostró resultados similares a los aquí presentados (datos no mostrados).

Tal y como ocurriera en las plantas, en los callos tampoco se observó una relación positiva entre cantidad de mRNA y proteína recombinante ($r^2=0.32$) (Figura 20B). No obstante, cuando se analizaron los clones con menores niveles de expresión se observó que ambos parámetros se correlacionaban positivamente ($r^2=0.95$).

4. RESULTADOS

A



B

Callo	wt	1	2	3	4	5	6	7	8
hPLr (%)	0	1.2	0	1.2	1.9	1.3	1.3	1.7	1

Figura 20. Niveles relativos de mRNA del gen *hPL₃* en distintos callos transgénicos de tabaco cuantificados mediante PCR en tiempo real. **A**, niveles de expresión relativizados al callo 1 y normalizados frente a los niveles del gen endógeno 18S del RNA ribosómico (rRNA); **wt**, control negativo, callo no transformado; **1-8**, líneas transgénicas analizadas. **B**, niveles de producción de hPL recombinante expresados como porcentaje respecto a la cantidad de PTS. La cuantificación se realizó mediante ELISA.

Comparando los niveles de mRNA de callos con los de plantas se pudo observar que existía cierta relación entre ambos tejidos. La planta con el nivel de transcritos más alto fue la que originó el callo con mayor cantidad de transcritos del gen *hPL₃*. También se observó que las plantas con menores niveles de mRNA originaron callos con los niveles de transcrito más bajos. Se observó una única excepción, la línea 5, cuyo nivel de transcritos era elevado en tejido foliar y sin embargo, fue una de las que menor nivel presentó en callo. También cabe destacar que el callo 2 no presentó niveles detectables de mRNA del gen *hPL₃*, mientras que la planta que lo originó si mostró niveles detectables de transcripción.

4.11.2. Análisis de la producción de la proteína hPL recombinante en callos transgénicos

Dado que los callos cultivados en el medio MCTA mostraron mayor tamaño, y por lo tanto, mayor proliferación celular, fueron seleccionados para caracterizar la producción de la proteína recombinante a nivel de callo. El análisis de presencia y cantidad de lactógeno

4. RESULTADOS

placentario se realizó mediante las técnicas western blot y ELISA, respectivamente, tal y como se hiciera con las plantas transgénicas.

En el análisis western blot los extractos proteicos de los callos derivados de las plantas pNEKhPL1 (en adelante callos pNEKhPL1) mostraron una banda mayoritaria del peso molecular esperado (22 kDa) que migró a la altura del control positivo de hPL comercial empleado (Figura 21). El extracto vegetal del callo no transformado no mostró reacción alguna con el anticuerpo policlonal anti-hPL utilizado.

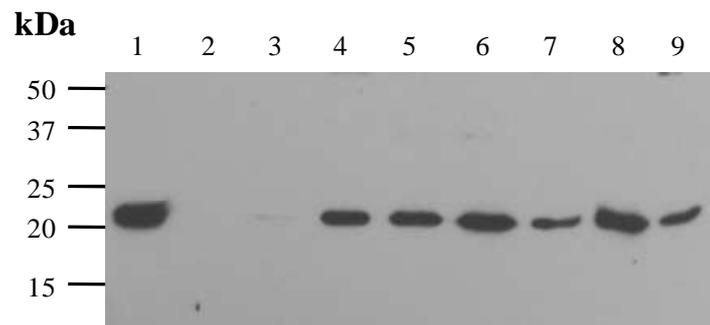


Figura 21. Inmunodetección de la proteína hPL recombinante con un anticuerpo policlonal anti-hPL, en extractos proteicos de callos pNEKhPL1. **1**, 40 ng de proteína hPL comercial (NeoMarkers); **2**, control negativo con extracto vegetal de un callo no transformado; **3-9**, extractos vegetales (10 µg) de distintos callos transgénicos.

En los callos derivados de las plantas pNEKhPL2 (en adelante callos pNEKhPL2) se observó una banda mayoritaria con un peso aproximado de 22 kDa y una segunda proteína minoritaria, con un peso molecular ligeramente superior al de la proteína comercial (Figura 22 A). Esta segunda banda se correspondería con la proteína recombinante fusionada a la cola de histidinas y a la señal de retención endoplasmática KDEL (24 kDa), tal y como se procesaría en la construcción genética pNEKhPL2. El extracto proteico del callo no transformado no mostró reacción con el anticuerpo policlonal anti-hPL empleado.

Ante la diferencia de tamaño observada, se procedió a detectar la proteína recombinante utilizando un anticuerpo anti-His. Se detectó una proteína mayoritaria del peso molecular esperado (24 kDa) que mostró una movilidad electroforética similar a la de la proteína recombinante purificada a partir de plantas pNEKhPL2 mediante cromatografía de afinidad (Figura 22B). El extracto vegetal del callo no transformado no mostró ninguna reacción con el anticuerpo anti-His.

4. RESULTADOS

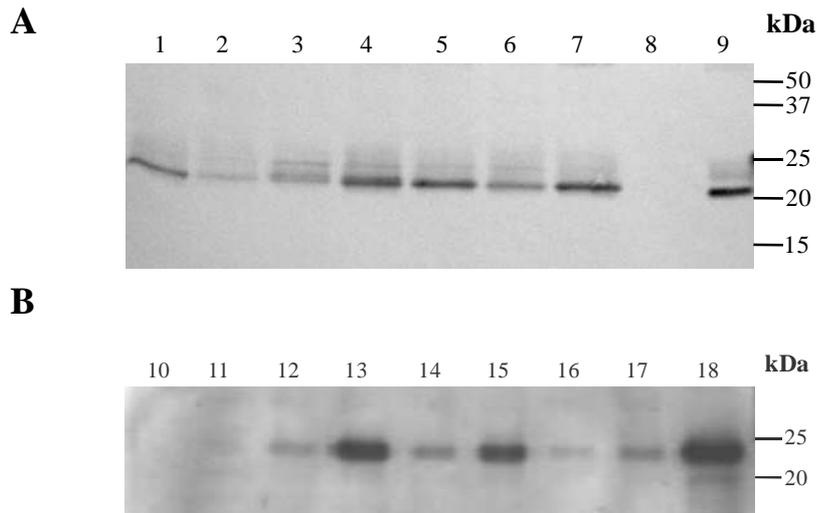


Figura 22. Inmunodetección de la proteína hPL recombinante (hPLr) en callos pNEKhPL2. **A**, detección con un anticuerpo policlonal anti-hPL; **1-7**, extractos proteicos (10 μ g) de distintos callos transgénicos; **8**, control negativo, extracto proteico de un callo no transformado; **9**, 100 ng de hPL comercial (NeoMarkers). **B**, detección con un anticuerpo anti-His; **10**, control negativo, extracto de un callo no transformado; **11-17**, extractos proteicos de las líneas transgénicas analizadas en A; **18**, control positivo con proteína hPLr purificada a partir de una planta pNEKhPL2, mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos.

La cuantificación de la proteína hPLr producida por los callos de tabaco fue realizada mediante ELISA tipo sándwich. Los callos pNEKhPL1 mostraron niveles de proteína recombinante que variaron entre el 0.36% y 0.9% de la PTS, con un nivel medio del 0.6%. Los callos pNEKhPL2 mostraron un nivel medio de producción del 1.2% de la PTS y valores que fluctuaron entre el 0.3% y 1.9% de la PTS.

Los callos pNEKhPL2 produjeron 2 veces más proteína recombinante que los callos pNEKhPL1 (Figura 23). En comparación a la cantidad de proteína recombinante producida por las plantas transgénicas, las diferencias en los niveles de producción fueron más notables entre las líneas pNEKhPL1. En estas líneas, los callos produjeron 4 veces más proteína que las plantas cultivadas en el invernadero y 7.5 veces más que las cultivadas *in vitro*. Por otro lado, los callos pNEKhPL2 mostraron 1.7 veces más proteína que las plantas cultivadas en el invernadero y 2.3 veces más que las cultivadas *in vitro*.

No se observó una relación directa entre la cantidad de proteína recombinante y el tipo de tejido. Las plantas transgénicas que mayores niveles de hPLr tenían no originaron los callos más productores, ni en las líneas pNEKhPL1 ni en las líneas pNEKhPL2. Todos los callos analizados expresaban la proteína hPL, excepto uno de los clones pNEKhPL2, que sin embargo sí mostró niveles elevados en tejido foliar tanto *in vitro* como en el invernadero.

4. RESULTADOS

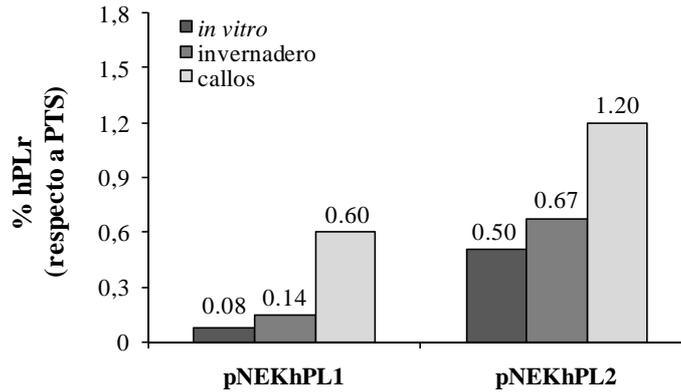


Figura 23. Niveles medios de producción de hPLr recombinante, expresados como porcentaje respecto a la cantidad de PTS, en plantas cultivadas *in vitro*, en plantas cultivadas en el invernadero, y en los callos originados a partir de las mismas (n=18).

4.12. Establecimiento y caracterización de suspensiones celulares

Una vez caracterizados los callos transgénicos cultivados en el medio de cultivo MCTA, tanto a nivel morfológico como molecular, se procedió al establecimiento de suspensiones celulares con el fin de analizar la producción de hPLr en este sistema y poder compararlo con el sistema basado en plantas.

La elección de los clones se basó en un consenso entre el nivel de producción y el crecimiento en medio sólido. Inicialmente, se optó por los clones más productores procedentes de cada construcción, que presentaron buen crecimiento en medio sólido.

El establecimiento de las suspensiones con el clon pNEKhPL1, en el que la proteína recombinante es dirigida al espacio apoplástico, se realizó tanto en el medio MCTA como en el MCTC, ya que los callos cultivados en MCTC fueron más blandos. Se obtuvieron suspensiones celulares homogéneas y con buen crecimiento, aunque se observaron diferencias de textura entre ambas. La suspensión establecida en el medio MCTC mostró menos tendencia a la formación de agregados celulares que sí se observaron en la suspensión cultivada en el medio MCTA (Figura 24).

4. RESULTADOS

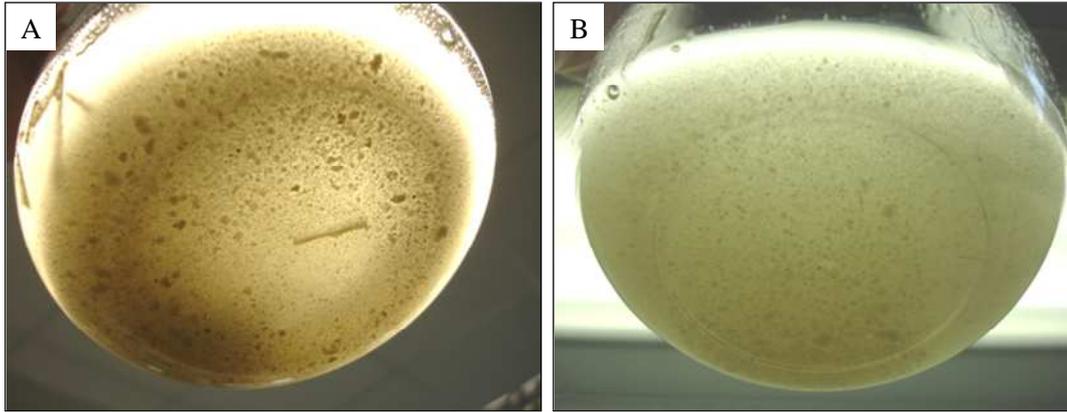


Figura 24. Suspensiones celulares transgénicas de tabaco obtenidas a partir de un callo pNEKhPL1 y cultivadas durante 10 días en los medios MCTA (A) y MCTC (B).

Las suspensiones obtenidas a partir del callo pNEKhPL2 seleccionado mostraron una gran tendencia a la agregación celular, tanto en el medio de cultivo MCTA como en el MCTC, dando lugar a la formación de estructuras esféricas de diferentes tamaños (Figura 25). Estos agregados no permitieron la obtención de una suspensión homogénea, dificultando el subcultivo de la misma, así como la toma de muestras. Por este motivo se optó por establecer suspensiones a partir de otros callos pNEKhPL2 que mostraban menores niveles de producción de hPLr. Sin embargo, estos clones mostraron la misma tendencia observada en el caso anterior, dando lugar a la aparición de estructuras similares (Figuras 25D y 25E).

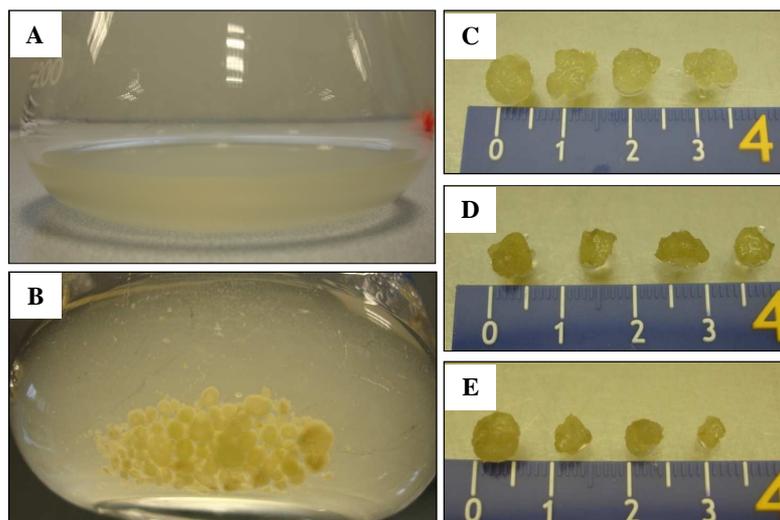


Figura 25. Suspensiones celulares transgénicas de tabaco establecidas a partir de clones pNEKhPL2 seleccionados, y cultivadas en medio MCTA. A, suspensión celular en el momento del subcultivo; B, aspecto de la misma suspensión tras 7 días de cultivo; C-E, detalle de los agregados celulares de los clones seleccionados. La escala se muestra en cm.

4. RESULTADOS

Ante la imposibilidad de establecer unas suspensiones homogéneas con los callos pNEKhPL2 y teniendo en cuenta que esta construcción está diseñada para que la proteína recombinante se acumule en el retículo endoplasmático, se optó por analizar las suspensiones pNEKhPL1. Como se ha comentado anteriormente, la construcción pNEKhPL1 permite la secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo.

La evolución de estas suspensiones celulares se analizó mediante la determinación de la biomasa (fresca y seca), la cantidad de PTS (intracelular y extracelular) y la cantidad de proteína recombinante presente en el interior celular y en el medio de cultivo.

4.12.1. Evolución de la biomasa de las suspensiones celulares

A lo largo del cultivo, las suspensiones celulares mostraron las tres fases de crecimiento; la de latencia, la exponencial y la estacionaria.

La suspensión transgénica cultivada en el medio MCTA mostró una fase de latencia que se prolongó hasta los 4 días de cultivo, seguida de la fase exponencial que tuvo una duración de 18 días (Figura 26A). Tras alcanzar el punto máximo de biomasa fresca ($219.24 \pm 3.95 \text{ g l}^{-1}$) al final de la fase exponencial, los cultivos entraron en la fase estacionaria y finalmente de muerte, momento en el cual la biomasa comenzó a disminuir. En el caso de la suspensión transgénica cultivada en el medio MCTC, la biomasa fresca mostró también una fase de latencia de 4 días (Figura 26B). A partir de ese momento, la biomasa fue incrementándose gradualmente hasta obtener el máximo ($300.5 \pm 1.84 \text{ g l}^{-1}$) al 14º día de cultivo. La fase estacionaria tuvo 3 días de duración, mostrando una tendencia constante. Las suspensiones control (wt) mostraron tendencias similares a sus homólogas transgénicas, si bien en la cultivada en medio MCTC la biomasa fresca máxima fue ligeramente inferior ($223.3 \pm 15.19 \text{ g l}^{-1}$).

La evolución de la biomasa seca fue similar en ambas suspensiones (Figuras 26C y 26D). La fase de latencia se prolongó hasta el 4º día de cultivo, y la fase exponencial hasta el 15º día, obteniéndose una biomasa máxima de 14.2 g l^{-1} en la suspensión cultivada en medio MCTA, y de 13.65 g l^{-1} en la cultivada en medio MCTC. La fase estacionaria se extendió hasta el final del cultivo con una disminución progresiva de la biomasa que fue más acusada en la suspensión cultivada en medio MCTA. Las suspensiones control (wt) produjeron biomazas máximas similares a las de las transgénicas, aunque con un desfase de entre 1-3 días.

4. RESULTADOS

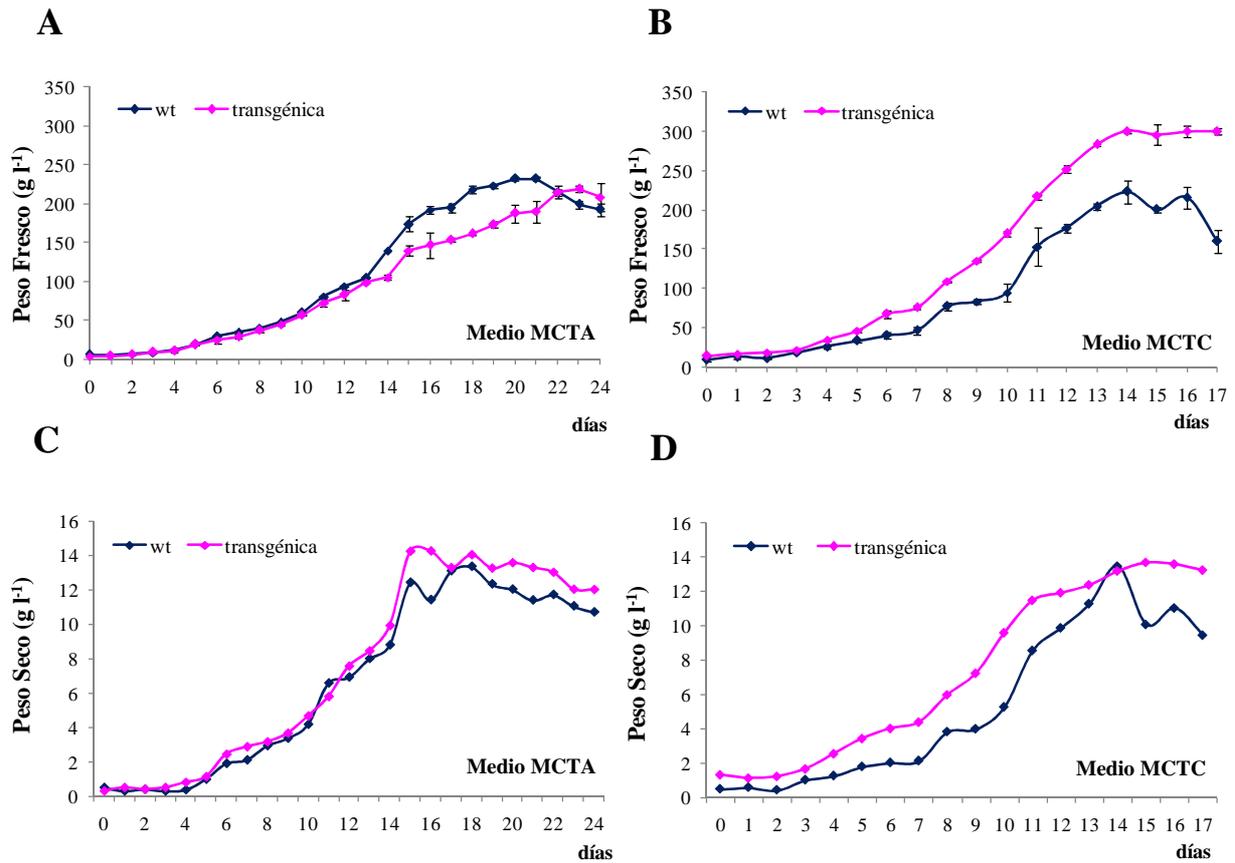


Figura 26. Evolución de la biomasa fresca y seca de las suspensiones celulares cultivadas en medio MCTA (A y C) y medio MCTC (B y D). **wt**, suspensión celular no transformada; **transgénica**; suspensión celular transgénica pNEKhPL1.

4.12.2. Evolución de la cantidad de proteína total soluble (PTS) de las suspensiones celulares

La evolución de la cantidad de PTS intracelular fue similar en ambas suspensiones transgénicas (Figuras 27A y 27B), aumentando desde el inicio y alcanzando su nivel máximo a los 15 días de cultivo. El máximo de PTS fue de $1.88 \pm 0.008 \text{ g l}^{-1}$ en la suspensión cultivada en medio MCTA, y de $1.45 \pm 0.1 \text{ g l}^{-1}$ en la cultivada en el medio MCTC. Posteriormente, la cantidad de proteína soluble disminuyó progresivamente hasta el final del cultivo. En ambos casos, la cantidad máxima de proteína soluble intracelular fue detectada en el punto máximo de biomasa seca. Las suspensiones control (wt) mostraron tendencias similares a sus respectivas suspensiones transgénicas.

La tendencia de la cantidad de PTS extracelular fue diferente en ambos tipos de suspensiones. En la suspensión cultivada en el medio MCTA, la cantidad de PTS se incrementó notablemente a partir del 4º día de cultivo hasta el 10º, momento a partir de cual

4. RESULTADOS

se mantuvo constante durante 8 días (Figura 27C). A partir del 18º día, la cantidad de PTS vuelve a incrementarse hasta alcanzar el máximo ($0.25 \pm 0.006 \text{ g l}^{-1}$) al final del cultivo. Por otro lado, la suspensión cultivada en medio MCTC mostró un aumento progresivo de la PTS hasta el alcanzar el máximo ($0.18 \pm 0.008 \text{ g l}^{-1}$) a los 8 días de cultivo (Figura 27D). Posteriormente, la PTS disminuyó progresivamente hasta el 14º día de cultivo, para volver a incrementar hasta el final del proceso. Las suspensiones no transformadas mostraron tendencias similares a las transgénicas, si bien se obtuvieron máximos de PTS inferiores.

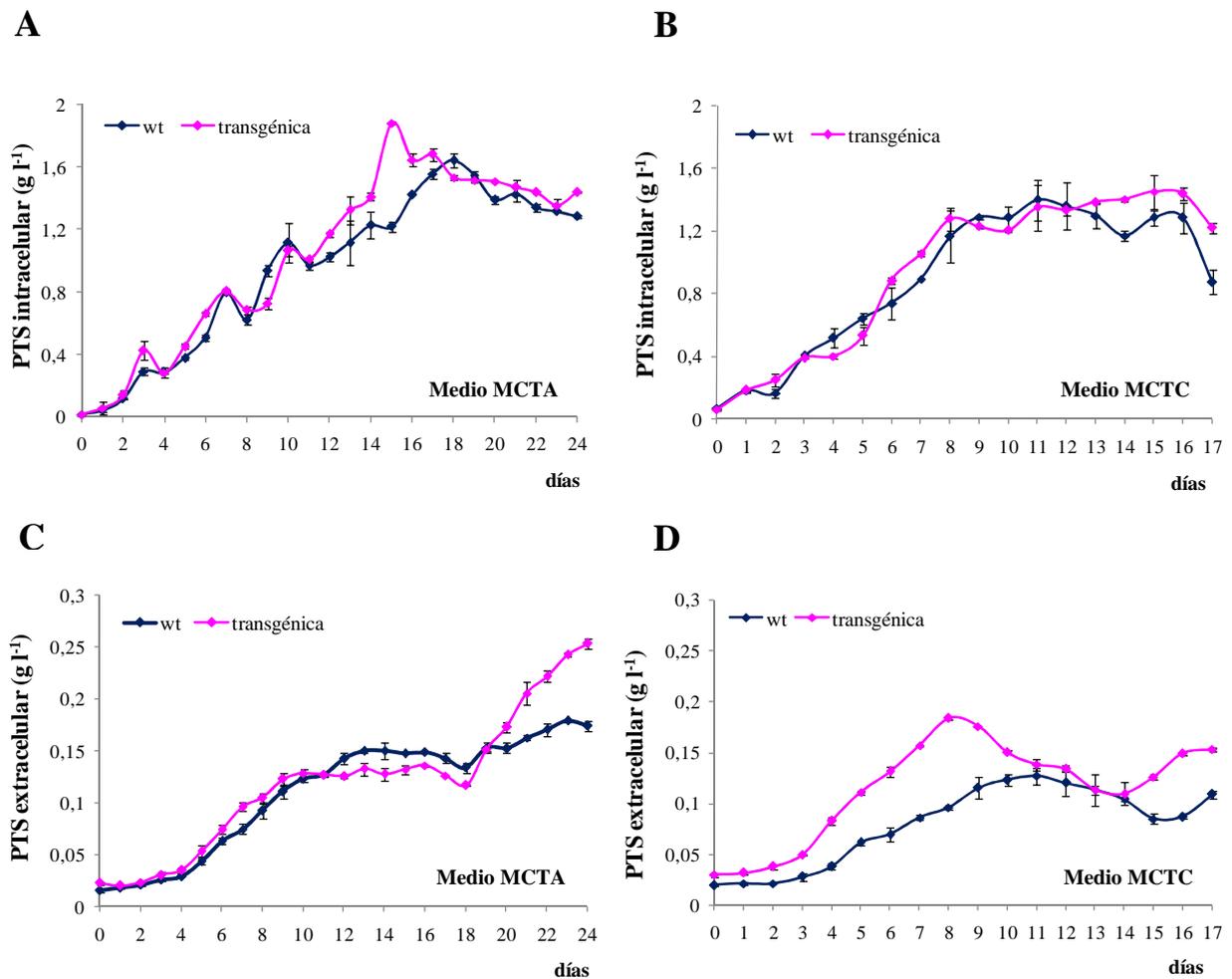


Figura 27. Producción de proteína total soluble (PTS) intracelular y extracelular en las suspensiones celulares cultivadas en medio MCTA (A y C) y medio MCTC (B y D). wt, suspensión celular no transformada; transgénica; suspensión celular transgénica pNEKhPL1.

4. RESULTADOS

4.12.3. Detección y cuantificación de la proteína hPL recombinante producida en suspensiones celulares transgénicas

El correcto procesamiento de la proteína recombinante producida por las suspensiones transgénicas se determinó mediante la técnica western blot, mientras que para determinar la cantidad de proteína producida en cada tipo de suspensión celular se utilizó la técnica ELISA.

La inmunodetección de la fracción intracelular reveló la presencia de una única banda del peso molecular esperado (22 kDa) en ambos tipos de suspensiones celulares, y que no aparecía en la suspensión no transformada (Figura 28A). En la suspensión cultivada en el medio MCTA, la detección de la proteína se produjo entre los días 2 y 7 de cultivo, mostrando un máximo a los 15 días. Posteriormente, la intensidad de la detección aumentó a partir del día 18 hasta el final del cultivo. En la suspensión cultivada en el medio MCTC la detección se produjo a los 2 días de cultivo, con máximos de proteína recombinante a los 7-8 y 15 días.

La detección extracelular de la proteína recombinante mostró patrones diferentes entre ambos tipos de suspensiones celulares (Figura 28B). En la suspensión cultivada en el medio MCTA se detectó una proteína del peso molecular esperado (22 kDa) al final del cultivo, junto con otra de un peso inferior. Por el contrario, en la suspensión cultivada en el medio MCTC, la proteína, cuya movilidad electroforética era similar a la del control comercial, se detectó entre los 3 y 7 días de cultivo, aumentando la intensidad de la detección hasta el final del cultivo (Figura 28D).

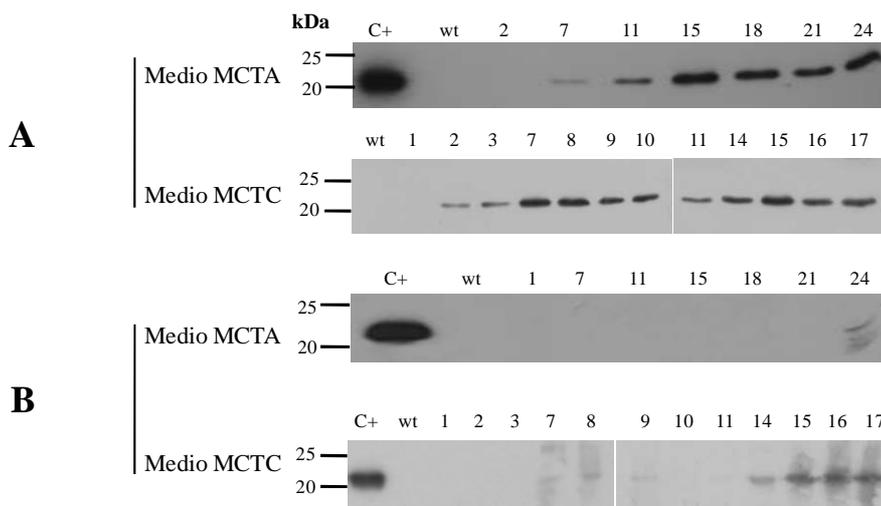


Figura 28. Detección mediante western blot de la proteína hPL recombinante producida en suspensiones celulares transgénicas de tabaco. **A**, fracción intracelular de las suspensiones cultivadas en los medios MCTA y MCTC; **B**, fracción extracelular de las suspensiones cultivadas en los medios MCTA y MCTC. **C+**, control positivo con 10 ng hPL comercial (NeoMarkers); **wt**, suspensión no transformada; **1-24**, días de cultivo.

4. RESULTADOS

Respecto a la cuantificación de la proteína hPLr en las suspensiones cultivadas en el medio MCTA, la cantidad de proteína intracelular aumentó a partir del tercer día de cultivo mostrando una tendencia ascendente (Figura 29A). El máximo de proteína recombinante ($50.8 \pm 0.35 \mu\text{g l}^{-1}$) se obtuvo a los 15 días, coincidiendo con los máximos de biomasa seca (Figura 26C) y PTS intracelular (Figura 27A). A partir de ese momento la cantidad de proteína cayó para volver a incrementarse hasta el final del cultivo. En las suspensiones cultivadas en el medio MCTC, se observó un incremento gradual de la cantidad de hPLr hasta el 6° día de cultivo, para posteriormente disminuir ligeramente y volver a aumentar a partir de día 13 hasta el final del cultivo. El máximo de hPLr se obtuvo a los 16 días, acumulando $100.13 \pm 0.44 \mu\text{g l}^{-1}$ de proteína.

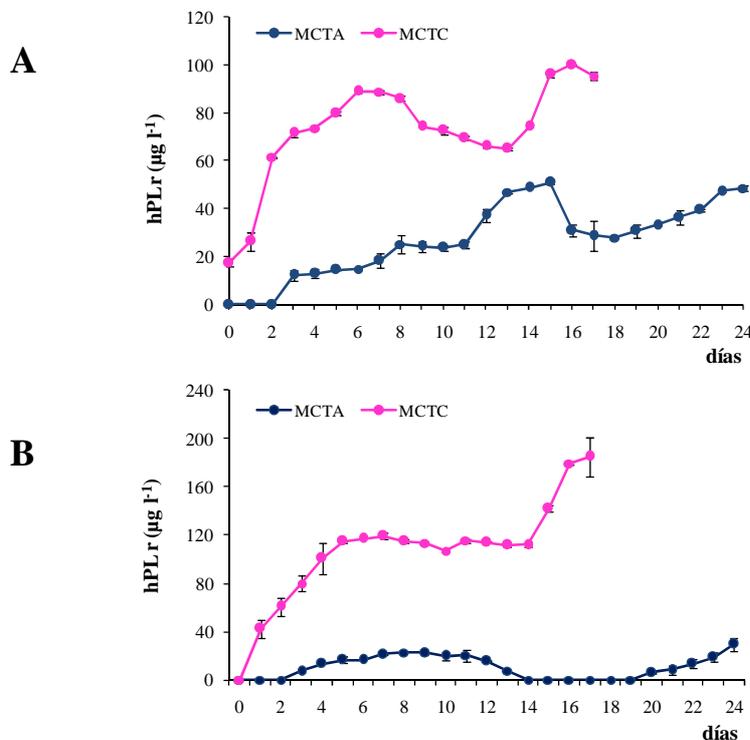


Figura 29. Cuantificación mediante ELISA de la producción de proteína hPL recombinante en la fracción intracelular (A) y extracelular (B) de las suspensiones celulares transgénicas de tabaco cultivadas en los medios MCTA y MCTC.

La cuantificación de la proteína hPLr extracelular en la suspensión cultivada en el medio MCTA, mostró que la proteína era detectada al tercer día de cultivo (Figura 29B). A partir de ese momento se observó un incremento progresivo hasta detectar un primer máximo de $22.45 \pm 0.11 \mu\text{g l}^{-1}$ de hPLr a los 8 días de cultivo. Posteriormente la cantidad de proteína disminuyó hasta niveles indetectables, volviendo a ser detectada a los 20 días y alcanzando su

4. RESULTADOS

nivel máximo ($29.29 \pm 5.66 \mu\text{g l}^{-1}$) al final del cultivo. En la suspensión celular cultivada en el medio MCTC, se observó un incremento gradual de la cantidad hPLr hasta el 5° día de cultivo. Durante los siguientes 9 días la cantidad de proteína se mantuvo constante y se volvió a incrementar a partir del día 14 hasta el final del cultivo. Por ello, la cantidad máxima de hPLr se detectó a los 17 días, obteniendo $185.08 \pm 16.22 \mu\text{g l}^{-1}$ de proteína.

Dado que no fue posible detectar la proteína recombinante en el medio de cultivo MCTA durante 6 días, se analizó la actividad proteasa en el medio extracelular de la suspensión cultivada en ese medio. Los resultados mostraron que la actividad proteasa incrementaba a partir del 12° día de cultivo hasta alcanzar su punto máximo a los 17 días, y que posteriormente descendía hasta el final del cultivo (datos no mostrados).

En términos de cantidad máxima total de hPLr, en la suspensión celular cultivada en el medio MCTA se obtuvieron $77.93 \pm 6.7 \mu\text{g l}^{-1}$ de proteína al final del cultivo. De esta cantidad, el 37.59% se encontró en el medio extracelular y el resto fue retenido intracelularmente.

En el caso de la suspensión celular cultivada en el medio MCTC, se obtuvo un máximo de hPLr de $280.50 \pm 14.13 \mu\text{g l}^{-1}$ a los 17 días de cultivo, de los cuales el 65.98% se detectaron extracelularmente.

En términos de porcentaje de hPLr respecto a la cantidad de PTS, el nivel máximo de producción en la suspensión cultivada en el medio MCTC fue del 0.16%, y se obtuvo a los 3-4 días de cultivo.

5. DISCUSSION

El desarrollo de la biotecnología ha supuesto una revolución en la industria farmacéutica, al ofrecer la posibilidad de obtener proteínas terapéuticas al margen de su fuente natural de producción. Gracias a las técnicas de transformación genética, algunos organismos pueden ser utilizados como biofactorías para producir proteínas recombinantes capaces de tratar multitud de enfermedades humanas. Estas proteínas terapéuticas, también llamadas biofármacos, actualmente representan el principal producto de la industria farmacéutica (Knäblein, 2005), y el que mayor crecimiento está experimentando (Walsh, 2005). Lo que comenzó siendo una idea revolucionaria en el laboratorio se ha convertido en una potente industria que mueve miles de millones de dólares al año (Huang y MacDonald, 2009). Sin embargo, esta industria se sustenta en unos sistemas de producción, particularmente las células CHO y las bacterias, que no van a ser capaces de satisfacer la creciente demanda de biofármacos. Además, los esfuerzos que se están realizando a nivel genómico en la investigación de muchas enfermedades están aumentando el número de proteínas terapéuticas que podrán ser producidas en el futuro (Sivakumar, 2006). Los costes económicos asociados a la producción de proteínas en los sistemas actuales es elevado, debido a que el escalado y mantenimiento de los biorreactores es alto, por lo que el precio final del producto también es elevado (Twyman *et al.*, 2005). Por todo esto, parece bastante razonable pensar que hay que buscar sistemas de producción alternativos que liberen el “cuello de botella” que los sistemas actuales van a generar. Los organismos vegetales se perfilan como uno de los sistemas alternativos más interesantes puesto que ofrecen muchas ventajas respecto a los otros sistemas. Los costes de puesta en marcha del sistema son más bajos, los organismos vegetales son muy versátiles permitiendo el escalado y almacenamiento del producto final, y además, tienen el potencial de producir grandes volúmenes de producto con costes relativamente bajos (Sparrow *et al.*, 2007).

Los organismos vegetales han sido utilizados para la producción de multitud de proteínas terapéuticas, vacunas y anticuerpos. Las plantas ofrecen la posibilidad de producir vacunas que pueden administrarse oralmente mediante su producción en tubérculos, frutas o cereales. De esta forma, se eliminan los costes asociados a la purificación de la proteína. Se han obtenido plantas que producen vacunas contra la hepatitis B, el virus de la inmunodeficiencia humana o el virus del papiloma humano (Mason *et al.*, 1992; Obregon *et al.*, 2006; Fernández-San Millán *et al.*, 2008). Asimismo, las plantas son capaces de producir

5. DISCUSION

correctamente proteínas tan complejas como los anticuerpos, estructuras multiméricas que requieren de un correcto ensamblaje para su actividad (Pujol *et al.*, 2007).

Además de anticuerpos o citoquinas, las plantas también son capaces de producir hormonas (Gils *et al.*, 2005; Nykiforuk *et al.*, 2006). El lactógeno pacentario humano (hPL) es una hormona producida durante el embarazo con un gran potencial para el tratamiento de la diabetes tipo 1. Las personas con esta enfermedad sufren la destrucción autoinmune de las células β secretoras de insulina (World Health Organization, 1999) por lo que necesitan inyectarse insulina de forma exógena. Sin embargo, este tratamiento no permite la cura de la enfermedad, y supone una merma en la calidad de vida de estas personas. Desde hace unos años, el trasplante de islotes β pancreáticos se ha convertido en una opción interesante para tratar a los diabéticos tipo 1 (Narang y Mahato, 2006). Sin embargo, la baja disponibilidad de islotes humanos ha empujado a muchos grupos de investigación a desarrollar estrategias para aumentar la proliferación, función y supervivencia de los mismos (Rao *et al.*, 2005). La utilización de factores peptídicos de crecimiento, como el hPL, hace posible aumentar la masa de células β *in vitro*, antes del trasplante, o *in vivo* después del mismo (García-Ocaña *et al.*, 2001b).

Hasta la fecha, el lactógeno placentario humano se ha comercializado purificado a partir de tejido placentario, un proceso que encarece mucho el precio final del producto. Además, la obtención de la proteína a partir de tejido humano conlleva riesgos sanitarios de contaminación del producto con patógenos humanos y/o animales (Twyman *et al.*, 2003). Para poder investigar más en profundidad el potencial de la proteína hPL en los trasplantes de células pancreáticas sería necesario disponer de una fuente segura y barata de la misma.

Como se ha comentado anteriormente en esta memoria, el lactógeno placentario humano pertenece al clúster génico *hPL/hGH* localizado en el cromosoma 17 (Selby *et al.*, 1984). Debido al origen evolutivo común que tienen estos genes, su similitud es elevada, por lo que la amplificación se ha realizado utilizando unos cebadores ligeramente degenerados que permiten amplificar cualquiera de los genes del cluster. La amplificación por PCR ha dado como resultado un fragmento del tamaño esperado que tiene una similitud del 100% con la secuencia codificante del gen *hPL₃*. La secuencia amplificada se ha modificado en sus extremos 5' y 3' mediante la inserción de secuencias de restricción para posteriormente ser introducida en los vectores de expresión pGJ2750 y pTRAKc, y así obtener los vectores de expresión pNEKhPL1 y pNEKhPL2 utilizados en los experimentos de transformación genética.

5. DISCUSION

La transformación genética mediada por *A. tumefaciens* ha sido ampliamente utilizada en muchas especies vegetales a lo largo de los años. El tabaco ha sido una de las especies más utilizada, por lo que su protocolo de transformación está bien establecido.

El método descrito por Horsch *et al.* (1985) ha permitido la obtención de plantas transgénicas en un número dependiente de la cepa de *A. tumefaciens* empleada. En este trabajo se han utilizado las cepas EHA105 y GV3101 con el fin de determinar su virulencia en explantos foliares de tabaco. Utilizando la cepa EHA105, portadora del vector pNEKhPL1, se han regenerado 51 plantas transgénicas, y con la cepa GV3101, portadora del vector pNEKhPL2, se han obtenido 21 plantas. La cepa EHA105, descrita como hipervirulenta debido que posee copias extra de los genes *virB*, *virC* y *virG* (Sairam *et al.*, 2003), ha demostrado ser el doble de eficiente que la cepa GV3101 en la transformación del cultivar Xanthi. En el caso de la transformación de células BY-2 de tabaco, Oyanguren (2009) ha obtenido resultados muy similares a los aquí presentados, utilizando los mismos vectores de expresión y las mismas cepas bacterianas. En otras especies también se ha observado que la cepa EHA105 es más efectiva que la cepa GV3101 (Le *et al.*, 2001; Bae *et al.*, 2005), demostrando que tanto en diferentes variedades de tabaco como en especies distintas los resultados son parecidos.

Otro factor importante a tener en cuenta en el proceso de transformación genética lo representan los antibióticos, ya que pueden influir en la capacidad de regeneración de los tejidos. La cefotaxima es un antibiótico ampliamente utilizado para la eliminación de agrobacterias tras el cocultivo. En este trabajo, ha sido suficiente una concentración de 250 mg l⁻¹ para controlar el crecimiento bacteriano, pese a que otros autores emplean una concentración de 500 mg l⁻¹ (Nauerby *et al.*, 1997). Aunque en el caso de otras especies se ha descrito que la cefotaxima es capaz de aumentar la regeneración de tejidos (Yepes y Aldwinckle, 1994; Humara y Ordás, 1999), en tabaco no parece influir en la producción de tallos a partir de discos foliares, aunque si se han observado efectos negativos sobre el enraizamiento (Nauerby *et al.*, 1997). En este trabajo no se han observado, aparentemente, efectos negativos en el enraizamiento de las plantas regeneradas, pese a mantenerlas durante un tiempo en presencia de cefotaxima. La kanamicina es otro de los antibióticos más empleados en el proceso de transformación, ya que se emplea como agente de selección de las células transformadas. En este trabajo se ha observado que una concentración de 100 mg l⁻¹ es suficiente para seleccionar el tejido transformado.

Durante el proceso de obtención de plantas transgénicas se ha observado la presencia de un único clon con un fenotipo diferente al de las plantas silvestres y el resto de las plantas

5. DISCUSION

transgénicas regeneradas. Debido a que la inserción del T-DNA en el genoma vegetal ocurre al azar, y en la mayoría de los casos en zonas transcripcionalmente activas (Gelvin, 2003), esto podría producir disrupciones de genes importantes para el correcto desarrollo de la planta, que podrían dar lugar a las alteraciones morfológicas observadas en este y otros trabajos.

Una vez obtenidas las plantas regeneradas del proceso de transformación genética, éstas han sido analizadas mediante PCR para determinar la integración del carácter transgénico en su genoma. Aunque la capacidad para crecer en presencia de kanamicina nos da un primer indicio de su carácter transgénico, no nos asegura que las plantas realmente tengan integrado el transgén en su genoma. El análisis molecular se ha realizado mediante la amplificación de los genes *hPL₃* y *nptII* en todas las plantas cultivadas en presencia del agente de selección. El resultado ha demostrado que todas las plantas tienen integrados en su genoma ambos genes. A este respecto, cabe mencionar que en los vectores de expresión utilizados en este trabajo, el gen *hPL₃* se encuentra localizado cerca del borde derecho, mientras que el gen de selección *nptII* está localizado cerca del borde izquierdo. Ya que la inserción de T-DNA se realiza por el borde derecho (Zhu *et al.*, 2000), con estos vectores aseguramos que el transgén se introduzca primero en el genoma vegetal, y el gen de selección en último lugar. De este modo, se evitan falsos positivos debido a integraciones incompletas del T-DNA.

Tras comprobar el carácter transgénico de las plantas de tabaco, se ha estudiado la actividad transcripcional del gen *hPL₃* en algunas de las plantas transgénicas obtenidas. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que todas las plantas analizadas expresan transcritos del gen *hPL₃*, aunque se observan diferencias cuantitativas en los niveles de expresión en función del clon. Estas variaciones podrían ser debidas al lugar de inserción del transgén así como al número de copias que se han insertado (Ritcher *et al.*, 2000). El resultado obtenido ha mostrado cierta correlación positiva entre la cantidad de proteína y los niveles de mRNAs, aunque esta correlación no se produce en el 100% de los clones analizados. Algunos autores han observado que las diferencias a nivel transcripcional no siempre se correlacionan con la cantidad de proteína producida (Park *et al.*, 2002; Biemelt *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003). Esta falta de correlación puede deberse a diferencias relacionadas con la eficiencia de la traducción (Gallie y Walbot, 1992), presencia de secuencias desestabilizadoras del RNA (Girard *et al.*, 2004), y/o diferencias en la preferencia de uso de codones (Lessard *et al.*, 2002). Por otro lado, hay que tener en cuenta que las proteínas recombinantes pueden ser degradadas por proteasas vegetales, dificultando su detección pese a la presencia de transcritos (Doran, 2006b). Finalmente, la falta de

5. DISCUSION

correlación podría deberse a diferencias en el estado fisiológico de las plantas en el momento de la extracción (Farrán, 2000).

Una vez corroborada la inserción estable y la expresión del transgén *hPL*₃, se ha procedido a la detección inmunoenzimática de la proteína recombinante mediante un anticuerpo policlonal anti-hPL. En las plantas *pNEKhPL1*, la proteína recombinante producida presenta el mismo tamaño que el control hPL humano comercial, 22 kDa, y como cabe esperar, no se observa en el extracto de la planta no transformada. En todas las muestras analizadas, se detecta una segunda proteína de 37 kDa, incluyendo el control negativo de planta no transformada, lo que indica que la señal se debería a una reacción inespecífica del anticuerpo empleado con una proteína endógena del tabaco.

En las plantas *pNEKhPL2* la proteína recombinante ha mostrado un tamaño de 24 kDa debido a la presencia de las secuencias KDEL y His-tag en el extremo carboxilo-terminal de la proteína recombinante que aumentan la masa molecular del hPL en aproximadamente 2 kDa. Otros autores también han observado este aumento en la masa molecular de otras proteínas recombinantes (Sack *et al.*, 2007). Además de la proteína recombinante, también se ha detectado la presencia de una segunda proteína de 37 kDa, que aparece tanto en las muestras proteicas de plantas transgénicas como en las de la no transformada. Este resultado, junto con lo observado en las plantas *pNEKhPL1*, refuerza la idea de que se trataría de una reacción inespecífica, un hecho también descrito por otros autores (Gutiérrez-Ortega *et al.*, 2005). Cabe destacar que esta interferencia no habría influido en la cuantificación del hPLr mediante ELISA, ya que estos ensayos se han realizado con dos anticuerpos que reconocen diferentes epítomos de la proteína hPL.

Aunque en muchos casos el péptido-señal de las proteínas humanas es sustituido por uno de origen vegetal para asegurar un procesamiento correcto, no existen evidencias claras que demuestren que los péptidos vegetales induzcan a una expresión más eficiente de las proteínas recombinantes (Faye *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el péptido señal de la proteína hPL humana es procesada correctamente, demostrando que las células vegetales son capaces de procesar secuencias de mamífero y de otras especies (Ruggiero *et al.*, 2000; Panahi *et al.*, 2004; Nemchinov *et al.*, 2006) al igual que ya sugirieran otros autores. Sin embargo, en el western blot también se ha observado la presencia de una tenue banda de más de 24 kDa en algunas plantas que podría representar la forma no madura de la proteína hPL.

5. DISCUSION

Tras corroborar que la proteína recombinante es procesada correctamente en las células vegetales, manteniendo su capacidad antigénica, se procedió a la cuantificación de la producción de hPLr mediante la técnica ELISA.

En este trabajo, se ha analizado la influencia del tipo de cultivo sobre los niveles de producción de la proteína hPL en ambos tipos de plantas, pNEKhPL1 y pNEKhPL2, observando un aumento en los niveles de producción de la proteína recombinante cuando las plantas eran cultivadas en el invernadero. Las diferencias no han sido significativas entre las plantas pNEKhPL1 cultivadas *in vitro* e invernadero, pero si entre las plantas pNEKhPL2, que han mostrado niveles de lactógeno significativamente superiores al cultivarlas en el invernadero. Las condiciones de cultivo *in vitro* pueden resultar estresantes para las plantas al provocar cambios estructurales y fisiológicos en las mismas (Hazarika, 2006) debido a que se utilizan medios artificiales, el porcentaje de humedad es muy elevado y el intercambio gaseoso limitado (Kadlecěk *et al.*, 2001). Sin embargo, cuando las plantas son aclimatadas a las condiciones de invernadero pueden recuperar su morfología, anatomía y fisiología normales, tal y como han descrito otros autores (Pospíšilova *et al.*, 1999). Por lo tanto, los niveles de producción observados en las plantas cultivadas *in vitro* podrían deberse a las condiciones estresantes del tipo de cultivo empleado. Otros autores también han observado mayores niveles de proteína recombinante cuando las plantas son cultivadas en el invernadero y se emplea como regulador el promotor 2x35S CaMV, mientras que con el promotor 35S CaMV no se aprecian diferencias (Castañón *et al.*, 2002), de acuerdo a lo observado en este trabajo.

Las plantas pNEKhPL1 cultivadas en el invernadero, han alcanzado un nivel medio de producción del 0.14 % de la PTS, con un nivel máximo del 0.4%. Estos valores se encuentran en el rango de lo descrito por otros autores con vectores similares al vector pNEKhPL1 (Avesani *et al.*, 2002; Ehsani *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Obregon *et al.*, 2006), donde el gen se encuentra bajo el control del promotor 35S CaMV, un promotor constitutivo ampliamente utilizado en la producción de proteínas recombinantes en sistemas vegetales (Benfey *et al.*, 1990; Mitsuhara *et al.*, 1996). Los niveles de proteína recombinante alcanzados con este tipo de promotor varían entre el 0.1% de la PTS y el 1.18%, alcanzando valores máximos de hasta el 14% de la PTS (Verwoerd *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 2004).

Los niveles de expresión alcanzados con el vector pNEKhPL1 podrían no ser suficientes para el establecimiento de un sistema vegetal de producción de lactógeno, por lo que en este trabajo se ha optado por el uso de un vector de expresión alternativo. El vector pNEKhPL2 representa una mejora sustancial en el aumento de los niveles de expresión, ya

5. DISCUSION

que las plantas pENKhPL2 cultivadas en el invernadero han mostrado un nivel de expresión medio del 0.68% de la PTS y un máximo del 1%. Este nivel máximo de expresión está considerado el valor crítico de producción para que el sistema vegetal pueda competir con los otros sistemas recombinantes (Kusnadi *et al.*, 1997). Los niveles de producción de las plantas pNEKhPL2 están en el rango de lo publicado por otros autores que emplean vectores similares (Verwoerd *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2006; Maclean *et al.*, 2007; Bortesi *et al.*, 2009).

Analizando los niveles de producción de las plantas transgénicas obtenidas en este trabajo, observamos que las plantas pNEKhPL2 producen 4.8 veces más proteína recombinante que las plantas pNEKhPL1, lo que representa una diferencia estadísticamente significativa. Como ya se ha comentado anteriormente, en el vector pNEKhPL2 el transgén está bajo el control transcripcional del promotor 2x35S CaMV, un variante del promotor 35S CaMV con una actividad transcripcional hasta 10 veces superior, y construido mediante la duplicación de una secuencia de 250 pb descrita como intensificadora o “enhancer” (Kay *et al.*, 1987). Otros autores también han observado niveles de producción entre 3 y 5 veces superior en plantas de patata, utilizando el doble promotor respecto al sencillo (Castañón *et al.*, 1999).

La expresión del transgén no solo depende del tipo de promotor utilizado, ya que existen otras secuencias que regulan la expresión. La secuencia 5'UTR CHS del gen de la *calcona sintasa* empleada en este trabajo, podría estar implicada en el aumento de la cantidad de hPLr observado en las plantas pNEKhPL2. En general, las secuencias 5'UTR han sido descritas como activadoras de la traducción (Lessard *et al.*, 2002), y la de la *calcona sintasa* en concreto, es una secuencia capaz de mejorar la eficiencia de la traducción en células de tabaco, y a la que se atribuye un efecto equivalente a la secuencia Ω del virus TMV (Torres *et al.*, 1999). La secuencia 5'UTR de la *calcona sintasa* o la secuencia Ω del TMV son dos ejemplos ampliamente utilizados en la producción de proteínas de interés en plantas, que han demostrado ser capaces de mejorar eficientemente la traducción de los transgenes (Torres *et al.*, 1999; Schiermeyer *et al.*, 2005; Sorrentino *et al.*, 2005).

La secuencia KDEL incluida en el extremo carboxilo-terminal del lactógeno en el vector pNEKhPL2, permite acumular la proteína en el retículo endoplasmático. El aumento en la producción del hPLr en las plantas pNEKhPL2 podría atribuírsele a esta secuencia, ya que en trabajos anteriores ha permitido incrementar los niveles de producción entre 4.5 y 100 veces, tanto en protoplastos de tabaco como en plantas (Schouten *et al.*, 1996; Fiedler *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 1999c; Torres *et al.*, 1999). El retículo es un orgánulo con una actividad

5. DISCUSION

hidrolítica muy baja que permite la acumulación de proteínas sin comprometer el desarrollo de la planta (Vitale y Pedrazzini, 2005), ya que es un orgánulo plástico con capacidad de expansión para convertirse en un reservorio de proteínas y cuerpos oleicos (Chrispeels y Herman, 2000). Las proteínas recombinantes acumuladas en el retículo están protegidas de la degradación proteolítica, y se favorece el correcto plegamiento y la formación de enlaces disulfuro (Conrad y Fiedler, 1998; Benchabane *et al.*, 2008).

En el vector pNEKhPL2 también se ha incluido la secuencia SAR del gen *Rb7* de *N. tabacum*, una secuencia capaz de incrementar la proporción de células que expresan el transgén, reduciendo posiblemente, el silenciamiento génico mientras se incrementa el nivel de expresión (Allen *et al.*, 1993; Allen *et al.*, 1996; Halweg *et al.*, 2005). Se cree que las secuencias SAR son capaces de formar su propio dominio de cromatina, de manera que aíslan el transgén de las influencias de otros factores de la cromatina adyacente (Han *et al.*, 1997).

Además de la diferencia en los niveles de expresión, se ha observado una mayor variabilidad interna entre las plantas pNEKhPL1, en comparación con las plantas pNEKhPL2. En las plantas pNEKhPL1 la producción de la proteína recombinante ha variado entre el 0.01-0.42% de la PTS, lo que representa un nivel de proteína 42 veces superior en la planta más productora. En las plantas pNEKhPL2 estos valores han oscilado entre 0.14-1.00% de la PTS, disminuyendo 6 veces la diferencia entre el clon más productor y el menos productor. La inclusión de las secuencias SAR del gen *Rb7* flanqueando el cassette de expresión en el vector pNEKhPL2 podrían haber favorecido la reducción de esta variabilidad, ya que a estas secuencias se les atribuye un efecto reductor de la variabilidad (Breyne *et al.*, 1992; Mlynárová *et al.*, 1994; Mlynárová *et al.*, 1996). Existen otras causas que incrementan la variabilidad en la expresión de un transgén, como el número de copias insertadas en el genoma vegetal, y el lugar cromosómico en el que son insertadas, ya que el potencial de transcripción de cada lugar es diferente (Allen *et al.*, 1993; Finnegan y McElroy, 1994).

Como se deduce de los resultados mostrados hasta ahora, la optimización de los vectores de expresión resulta esencial para incrementar los niveles de expresión y hacer de las plantas un sistema de producción económicamente viable. En este caso se ha conseguido aumentar la cantidad de proteína 5 veces, alcanzando un nivel máximo del 1% de la PTS, gracias a las secuencias reguladoras empleadas, como el doble promotor 35S, la señal KDEL, la región 5'UTR y las secuencias SAR.

Las hormonas, entre ellas el lactógeno, ejercen su función en pequeñas cantidades. Algunos autores han observado alteraciones fenotípicas severas en plantas que expresan

5. DISCUSION

hormonas humanas o de otros mamíferos. Así, por ejemplo, la sobreexpresión de eritropoyetina humana provoca un retardo en el crecimiento de plantas de tabaco transgénicas y esterilidad masculina tanto en tabaco como en *Arabidopsis thaliana* (Cheon *et al.*, 2004). Niveles elevados de la hGH expresada en el citosol han resultado tóxicos en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Gils *et al.*, 2005), y la hormona del crecimiento bovina produce alteraciones en el sistema radicular de plantas de tabaco (Oh *et al.*, 2002). En este trabajo, la producción de la proteína hPLr, estrechamente relacionada con la hormona del crecimiento, no ha inducido cambios fenotípicos en las plantas transgénicas obtenidas. Todas las plantas transgénicas, excepto un clon pNEKhPL1, han mostrado un fenotipo normal e igual al de la planta no transformada, sugiriendo que la proteína hPL no resulta tóxica para la planta hospedadora, o que la inserción del transgén hPL₃ no ha alterado ningún gen importante para el desarrollo vegetal, en general. Cabe destacar que el único clon que mostró alteraciones morfológicas resultó ser estéril, al mostrar anteras más cortas de lo habitual que posiblemente no son capaces de autofecundar la planta. Posiblemente, esta alteración se deba a la inserción del T-DNA en una zona del genoma donde haya genes importantes para el desarrollo de la planta, más que a la producción del hPLr, tal y como se ha comentado previamente.

Tras el análisis molecular de las plantas transgénicas obtenidas, se procedió a testar si la proteína recombinante conservaba su actividad biológica. Para ello, la proteína fue purificada mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos, gracias a la inserción de 6 residuos de histidina en el vector de expresión pNEKhPL2. En este trabajo, la utilización de esta diana nos ha permitido obtener de forma rápida, sencilla y en un único paso cromatográfico, la cantidad suficiente de proteína hPLr para llevar a cabo los ensayos de actividad biológica.

La diana His-tag es una de las más utilizadas para purificar proteínas recombinantes. Puede encontrarse indistintamente en la región amino o carboxilo terminal, y permite purificar hasta el 90% de la proteína en un solo paso cromatográfico, disminuyendo costes y acortando el tiempo necesario para la obtención de la proteína pura (Arnau *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que el proceso de purificación representa un alto porcentaje de los costes económicos de la producción de proteínas recombinantes, es muy importante utilizar este tipo de sistemas. Su alta eficiencia de captura, su pequeño tamaño, y la posibilidad de escalar el proceso de purificación, son otras de las ventajas importantes que presenta el sistema (Woestenenk *et al.*, 2004; Block *et al.*, 2008).

5. DISCUSSION

El sistema de purificación empleado ha permitido la obtención de la proteína pura en la primera fracción de elución, obteniendo 2.4 µg de hPLr por cada g de tejido foliar. La inmunodetección muestra que la proteína tiene el tamaño esperado de 24 kDa, y además, permite determinar que la banda inespecífica de 37 kDa detectada en todas las muestras vegetales desaparece en la elución. La cantidad de proteína purificada ha sido superior a la obtenida en células BY-2 que producen hPLr utilizando el mismo protocolo de purificación descrito por Oyanguren. (2009). Esto demuestra que en el caso de la producción de hPLr, las plantas transgénicas producen mayor cantidad de proteína recombinante que las células BY-2.

Para su uso en los ensayos de determinación de la actividad, la proteína hPLr pura se ha resuspendido en PBS (pH 7.4) para adecuarla a las condiciones de los ensayos de actividad biológica, ya que la elución se realiza en presencia de imidazol.

Como se ha comentado en la introducción, el hPL es capaz de inducir cambios funcionales y estructurales en las células β mediante la activación de la ruta de señalización intracelular JAK2/STAT5 (Vasavada *et al.*, 2000). La cascada de reacciones que se produce termina con la fosforilación de la molécula STAT5 que a su vez es translocada al núcleo celular donde regula la expresión de diversos genes (Stout *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 2001).

Para testar la actividad del hPL producido en plantas se ha analizado su capacidad para activar la ruta de señalización JAK2/STAT5, así como su potencialidad para aumentar la división celular. En ambos tipos de experimentos, se ha utilizado la línea INS-1 de células pancreáticas diferenciadas derivadas de un insulinooma de rata que expresan los receptores de la PRL y proliferan en respuesta a factores de crecimiento (Fleenor *et al.*, 2000). Esta línea celular expresa también todos los miembros de la familia JAK, lo que permite testar la capacidad señalizadora de los factores de crecimiento (Stout *et al.*, 1997). Paralelamente, y con el fin de corroborar la actividad de la proteína en un entorno genético diferente, y más próximo a su aplicación terapéutica, se han utilizado también células β procedentes de islotes humanos.

Los experimentos de fosforilación de la molécula STAT5 realizados sobre la línea INS-1 han demostrado que la capacidad de fosforilación del hPLr es dependiente de la dosis empleada y similar a la del control positivo suministrado por el NIH. De esta manera se confirma que la proteína recombinante es reconocida por el receptor celular y es capaz de iniciar la cascada de señales intracelulares. Esto demuestra que las plantas de tabaco son capaces de producir la proteína hPL funcional.

En el caso de los islotes humanos ambos péptidos han sido capaces de inducir la fosforilación de la molécula STAT5 por encima de los niveles del control no estimulado,

5. DISCUSION

confirmando que también en un entorno genético humano los receptores celulares reconocen el hPL producido en plantas.

Uno de los cambios más notables que sufren las células β , debido a la acción del lactógeno, es el incremento de la división celular. La capacidad mitogénica del lactógeno recombinante ha sido analizada, como en el caso anterior, en la línea celular INS-1 y en islotes humanos.

El hPLr ha sido capaz de promover la división celular en la línea INS-1, de forma similar al control positivo suministrado por el NIH. Con la dosis más baja de hPLr testada (50 ng ml^{-1}) las diferencias más notables entre tratamientos se han observado al 4º día de cultivo. Posteriormente apenas se aprecia diferencia alguna, debido probablemente, a que la dosis es insuficiente para mantener el efecto durante los 6 días. En el caso de las dosis de 100 ng ml^{-1} y 200 ng ml^{-1} , las máximas diferencias se han observado a los 6 días de cultivo, coincidiendo con lo descrito por otros autores (Stout *et al.*, 1997). La dosis de péptidos más alta utilizada en este ensayo ha mostrado un efecto proliferativo superior en el caso del hPL producido en plantas, en comparación con el control positivo. Este aumento en la capacidad proliferativa del hPL producido en plantas podría reflejar una mayor potencia mitogénica, dato que coincide con lo obtenido por otros autores empleando células BY-2 (Oyanguren, 2009). En cualquier caso, sería necesario ampliar los ensayos de actividad para poder afirmar que el hPL producido en sistemas vegetales es más potente que el control positivo utilizado.

En este trabajo se han llevado a cabo estudios de actividad con la fracción eluida del proceso de purificación de una planta no transformada. De esta manera podemos analizar posibles interferencias de proteínas endógenas del tabaco que pudieran co-purificarse con el lactógeno recombinante. Como muestran los resultados, la muestra del extracto wt no ha sido capaz de estimular la proliferación celular por encima del nivel de las células no estimuladas, lo que indicaría que la proliferación es específica del hPL producido en plantas. Otros autores han analizado muestras no transformadas obteniendo resultados similares a los aquí presentados (Bortesi *et al.*, 2009). No obstante, cuando se ha empleado la dosis más alta de la muestra wt se ha obtenido un recuento celular inferior al de las células no estimuladas. Esto podría indicar un efecto inhibitorio en el crecimiento celular debido a la naturaleza tóxica del tabaco, o algún componente del tampón de extracción de proteínas tal y como han descrito autores previos (Panahi *et al.*, 2003; Panahi *et al.*, 2004). Este resultado indicaría que el hPLr tiene un efecto proliferativo superior al control positivo del NIH, si bien como se ha comentado anteriormente, este dato requeriría de un análisis más en profundidad.

5. DISCUSION

El análisis de la capacidad mitogénica del hPLr en células β humanas demuestra que la proteína producida en plantas también es capaz de inducir la proliferación celular de manera similar al control positivo, demostrando de nuevo, que la proteína mantiene su funcionalidad en un entorno genético humano.

Tomando estos resultados en conjunto, podemos afirmar que la proteína hPL producida en plantas transgénicas de tabaco conserva la capacidad de inducir en las células β los cambios necesarios para su utilización terapéutica en el tratamiento de la diabetes. El potencial mitogénico del hPL, unido a su capacidad protectora frente a la apoptosis celular (Fujinaka *et al.*, 2007), hacen de esta hormona un factor de crecimiento interesante para futuras estrategias dirigidas a la expansión de células humanas *in vitro* o *in vivo* tras el trasplante de las mismas (Vasavada *et al.*, 2006). Del mismo modo, estos resultados ponen de manifiesto la idoneidad del sistema basado en plantas transgénicas para la producción de hPL, demostrando que la proteína sintetizada es funcional y se obtiene de forma rápida y sencilla a partir del tejido foliar.

Finalmente, es importante resaltar, que ni la inclusión de una pequeña diana de histidinas ni la presencia de la secuencia KDEL han afectado la actividad biológica del hPL producido en plantas, tal y como han observado con otras proteínas recombinantes autores previos (Zheng *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

Una vez caracterizadas las plantas transgénicas, y analizada la actividad de la proteína recombinante, se ha estudiado si el hPLr se mantiene estable en las plantas de tabaco durante su ciclo de vida. La cantidad de proteína recombinante en la planta no solo depende de las limitaciones inherentes al hospedador, o de los ratios de transcripción y traducción, sino también de su estabilidad durante el proceso de síntesis y recuperación (Faye *et al.*, 2005; Schillberg *et al.*, 2005).

En este trabajo se ha analizado la cantidad de hPLr producida en plantas pNEKhPL2 cultivadas en el invernadero durante 3 meses. Las plantas de tabaco transgénicas han mostrado un desarrollo similar al de las plantas no transformadas, tanto en la floración, como en la producción de semillas, y han alcanzado tamaños similares, volviendo a poner de manifiesto que la síntesis de la proteína hPLr no afecta a ninguna fase de su desarrollo, al menos fenotípicamente.

Uno de los parámetros analizados y que ha presentado modificaciones importantes, ha sido la cantidad de PTS, la cual ha disminuido en un 47% al final del periodo de cultivo. Esta disminución se podría atribuir a la entrada de la planta en la fase de senescencia, un proceso

5. DISCUSSION

de degradación de los componentes celulares gracias al cual la planta puede reciclar los nutrientes y translocarlos desde los tejidos senescentes hacia los más jóvenes, y hacia los órganos de reproducción (Palma *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2000). Este proceso puede ser genéticamente controlado o inducido ambientalmente, aunque la mayoría de las veces se corresponde con la maduración de la planta y su inicio de la fase reproductiva (Huffaker, 1990). La disminución en la cantidad de la PTS observada en este trabajo coincide con las observaciones realizadas por otros autores al final del periodo de cultivo (Verwoerd *et al.*, 1995; Conley *et al.*, 2010).

Debido a que el contenido de PTS varía dependiendo del estado fisiológico de las plantas, la normalización respecto a este parámetro podría no ser del todo fiable (Molina *et al.*, 2004), por lo que la cantidad de hPLr se ha normalizado respecto al PF de cada muestra foliar. En este caso, la tendencia del contenido de hPL disminuye en un 26% al final del periodo de cultivo, una tendencia que coincide con la observada por Conley *et al.* (2010). Verwoerd *et al.* (1995) observan una tendencia que podría ser similar a la observada en este trabajo, si bien los intervalos de toma de muestra, así como el periodo de cultivo, son más cortos. Otros autores observan un aumento de la cantidad de proteína recombinante por PF hasta los 60 días de cultivo, coincidiendo con la floración de plantas trasplantómicas de tabaco, y posteriormente disminuye hasta aparecer los primeros frutos (Molina *et al.*, 2004; Fernández-San Millán *et al.*, 2007).

La síntesis de hPLr en plantas de tabaco no está afectada ni por la floración, ni por la aparición de frutos, ya que la disminución de la cantidad de la proteína se observa desde el primer mes de cultivo y no se observan cambios notables coincidiendo con ninguno de los dos procesos. Este dato coincide con lo observado por Conley *et al.* (2010) en cuyo caso la proteína también es retenida en el retículo endoplasmático. La retención endoplasmática podría ser la responsable de que la síntesis de las proteínas recombinantes no esté tan afectada por los procesos fisiológicos que sufre la planta.

Por otro lado, la disminución de la cantidad de hPLr no ha sido tan acusada como la de la PTS, lo que nos sugiere que la retención endoplasmática no sólo acumula la proteína, sino que además, la protege de la degradación mediada por proteasas vegetales durante el ciclo de vida del tabaco, especialmente en la fase de senescencia. Esto concuerda con lo observado en el western blot, donde no se aprecian fragmentos de hPLr de menor tamaño, ni siquiera al final del cultivo. Además, otros autores han observado que la retención endoplasmática de un anticuerpo en plantas de tabaco, permite que la proteína se mantenga estable durante varias semanas a temperatura ambiente en el tejido foliar cosechado (Fiedler *et al.*, 1997).

5. DISCUSSION

La degradación proteolítica es necesaria para que la planta pueda redistribuir los nutrientes durante la fase de senescencia, o para eliminar las proteínas que no se han procesado correctamente (Callis, 1995; Palma *et al.*, 2002). La acción de las proteasas vegetales contribuye al control general del metabolismo y de las rutas de transducción de señales, mediante la activación o hidrólisis de proteínas implicadas en procesos clave (Benchabane *et al.*, 2008). Además, las endoproteasas son necesarias para el correcto procesamiento post-traducciona l de muchas proteínas que de otra manera no alcanzarían su forma madura (Schaller *et al.*, 2004). Sin embargo, en el caso de proteínas recombinantes con aplicaciones terapéuticas, su estabilidad es un factor fundamental que determinará la homogeneidad del producto (Stevens *et al.*, 2000). Los problemas de heterogeneidad del producto final introducen variabilidad entre lotes, y dificultan la purificación debido a la presencia de proteínas incompletas, además de generar inconvenientes para su comercialización a nivel normativo (Doran, 2006b). Existen diferentes estrategias que permiten limitar la degradación de las proteínas en entornos heterólogos, como dirigir las proteínas a un orgánulo en particular, por ejemplo el RE, la co-expresión de inhibidores de proteasas o la utilización de proteínas de fusión (Schillberg *et al.*, 2005; Benchabane *et al.*, 2008).

Los ensayos realizados a lo largo del ciclo vital del tabaco nos permiten demostrar que la proteína recombinante se mantiene estable en las plantas de tabaco durante su ciclo de vida, y que esta cantidad se encuentra ligeramente influenciada por la edad de las plantas.

Por otro lado, podemos determinar que es posible escalar la producción de hPL en las condiciones ambientales empleadas en este trabajo. Es precisamente la posibilidad de escalar la producción en respuesta a la demanda del producto, lo que convierte a las plantas en un sistema de producción tan interesante (Almquist *et al.*, 2006). El análisis de la distribución temporal del hPLr a lo largo del ciclo vital de las plantas de tabaco nos podría ayudar a elegir el mejor momento de cosechado, ya sea en base a la cantidad máxima de proteína por PF, o por cantidad de PTS. En el caso del hPLr, el máximo de cantidad de proteína se obtiene a los 30 días, si bien la cantidad de proteína se mantiene estable hasta el final del cultivo, lo que implica que se podría alargar la cosecha hasta los 90 días. El cosechado a los 30 días, acorta el periodo de cultivo y evita la floración de las plantas eliminando posibles riesgos de dispersión de polen. Conley *et al.* (2010) proponen el cosechado periódico de las hojas jóvenes a medida que las plantas crecen, ya que de esa manera se puede conseguir la máxima cantidad de proteína recombinante en la menor cantidad de biomasa.

5. DISCUSION

Otro factor importante en los sistemas de producción basados en plantas, además de que la expresión de los transgenes sea estable a lo largo del ciclo vital de las plantas, es que la expresión sea transmitida a las siguientes generaciones.

El silenciamiento de los transgenes puede reducir de forma significativa la acumulación de proteínas recombinantes en plantas transgénicas, dificultando la explotación comercial de las mismas como biofactorías de producción (Conley *et al.*, 2010). Los fenómenos de silenciamiento génico pueden ocurrir a nivel transcripcional, donde el promotor suele ser inactivado, o a nivel post-transcripcional, en cuyo caso la secuencia codificante se ve alterada, ya sea por inestabilidad del RNA o porque éste es degradado. La metilación de los residuos de citosina se asocia con ambos procesos (Fojtova *et al.*, 2003).

En este trabajo se ha analizado el nivel de producción de hPLr en la progenie de una de las líneas pNEKhPL2. La mayor parte de las semillas analizadas (90%) han sido capaces de desarrollarse en presencia de 100 mg l^{-1} de kanamicina, por lo que muy probablemente contienen el gen *nptII* insertado en su genoma. La presión de selección ha sido la misma que se ha utilizado para discriminar los supuestos transformantes primarios durante el proceso de transformación genética. El análisis de los niveles de producción mediante ELISA ha demostrado que el T-DNA se ha transmitido intacto a la progenie analizada, ya que todas las plántulas productoras de hPLr han sido resistentes al antibiótico de selección. El transgén se ha heredado de manera estable, y además, los niveles de producción han sido superiores a los de las plantas pNEKhPL2, coincidiendo con lo observado por otros autores (Voss *et al.*, 1995; Zimmermann *et al.*, 1998; Ramírez *et al.*, 2003; Bortesi *et al.*, 2009) que indican que los niveles de proteína son parcialmente dependientes del estado zigótico de las plantas. En otros casos se ha observado que la progenie produce niveles de proteína menores, un hecho que estaría relacionado con el número de inserciones de T-DNA (Hüns *et al.*, 2008).

En este caso, la estabilidad generacional, así como los mayores niveles de expresión observados en la progenie, podrían estar relacionados con las secuencias SAR empleadas en el vector de expresión pNEKhPL2. Como se ha comentado anteriormente en este trabajo, las secuencias SAR son capaces de aumentar los niveles de expresión entre transformantes primarios (T_0) (revisado en Allen *et al.*, 2000). Sin embargo, también se ha descrito que la secuencia SAR del gen *Rb7* empleada en este trabajo, es capaz de aumentar 3 veces los niveles de expresión del gen GUS entre las plantas de tabaco T_0 y T_1 , y de disminuir la pérdida de expresión del transgén a solo un 6% de las líneas, en comparación con el 60% observado en la progenie sin secuencias SAR (Ulker *et al.*, 1999).

5. DISCUSION

En este trabajo, se ha analizado también la segregación del gen *nptII* en la progenie de una planta pNEKhPL1, y se ha observado que el 66% de las semillas germinadas son resistentes al antibiótico. Esta diferencia en la cantidad de líneas que expresan el gen *nptII* entre ambas progenies, podría deberse al efecto de la secuencia *Rb7* sobre el silenciamiento génico. Algunos autores coinciden en señalar un efecto protector de la secuencia *Rb7* frente al silenciamiento génico en plantas de arroz, donde en ausencia de esta secuencia las plantas sufren un 35% de reducción en los niveles de expresión (Vain *et al.*, 1999). En nuestro caso, sería necesario analizar más líneas transgénicas, tanto a nivel estructural (inserción del T-DNA en el genoma) como de expresión, para corroborar este resultado.

Los resultados analizados hasta el momento reflejan la idoneidad de las plantas de tabaco como sistema de producción de lactógeno placentario humano. La proteína recombinante es capaz de inducir la proliferación de células β y de activar la ruta señalizadora JAK2/STAT5, se mantiene estable en la planta durante 3 meses, y su expresión es transmitida a la siguiente generación. Además los niveles de expresión obtenidos nos permiten establecer un punto de partida interesante para analizar en términos económicos la ventaja de este sistema frente a los tradicionales.

El tabaco es la especie cultivada no comestible con mayor potencial de comercialización de proteínas recombinantes, gracias a su gran biomasa foliar, a la producción de semillas, y a que se puede cosechar varias veces al año, características todas ellas interesantes a la hora de escalar la producción (Sparrow *et al.*, 2007). Además es una especie que dispone de la infraestructura necesaria para el cultivo y cosechado (Ma *et al.*, 2003). Sin embargo, hay que tener en cuenta que además de las condiciones físicas de las plantas o su edad, factores externos como la intensidad lumínica o la temperatura también afectan a la cantidad de proteína recombinante sintetizada (Stevens *et al.*, 2000; Arlen *et al.*, 2007), incluso a los patrones de glicosilación (Elbers *et al.*, 2001). Por lo tanto, todos estos factores habrán de tenerse en cuenta a la hora de diseñar la producción a gran escala de las proteínas recombinantes.

Los organismos vegetales nos ofrecen una gran versatilidad, permitiéndonos producir proteínas recombinantes en diferentes tejidos. Además de en hojas o semillas, podemos producir proteínas recombinantes en raíces transformadas mediante *Agrobacterium rhizogenes*, que crecen activamente sin necesidad de fitohormonas y son cultivadas en biorreactores (Sivakumar, 2006). Las células vegetales pueden ser inmovilizadas mediante su

5. DISCUSSION

encapsulación utilizando alginato, carragenina o agar, de manera que quedan protegidas de daños mecánicos posibilitando la obtención de mayores concentraciones celulares, y permitiendo la fácil separación de células y medio de cultivo (Bodeutsch *et al.*, 2001). También pueden cultivarse de forma libre en suspensión, tanto en matraces como biorreactores. El cultivo en suspensión ofrece ventajas frente al uso de plantas cultivadas en campo o invernadero, como la posibilidad de secretar la proteína recombinante al medio de cultivo. La composición de los medios de cultivo, sin aporte externo de proteínas, facilita la recuperación y posterior purificación de las proteínas recombinantes, reduciendo los costes de producción (Hellwig *et al.*, 2004). Además, las suspensiones permiten el escalado de la producción mediante el uso de biorreactores que permiten realizar cultivos bajo condiciones absolutamente controladas y definidas. De este modo, podemos conseguir regularizar la producción en lo que respecta a la calidad y homogeneidad del producto, facilitándonos el cumplimiento de los requerimientos de la certificación GMP (Huang y McDonald, 2009). Por otro lado, las suspensiones evitan problemas relacionados con contaminantes agroquímicos, enfermedades, plagas, y condiciones variables del suelo o del microclima que afectan a las plantas en campo (Hellwig *et al.*, 2004). Además, las plantas requieren de un tiempo determinado para la siembra, cultivo, y cosechado antes de poder ser productivas, mientras que las suspensiones pueden producir la proteína de interés en cuestión de días o semanas (Doran, 2000). Utilizando suspensiones celulares se puede reducir la incidencia del silenciamiento génico post-transcripcional al minimizar el contacto intercelular (Huang y McDonald, 2009). También se evita la liberación de organismos genéticamente modificados al medio ambiente al utilizar sistemas de cultivo confinados (Weathers *et al.*, 2010). En definitiva, los cultivos celulares vegetales en suspensión integran las ventajas de la producción en plantas con las que ofrecen los sistemas *in vitro* de microorganismos y células animales (Huang y McDonald, 2009) para proveer de versatilidad a la producción de proteínas recombinantes con interés terapéutico.

Las ventajas que ofrecen los sistemas de células en suspensión son interesantes para abordar la producción de hPLr con aplicaciones terapéuticas, además de permitirnos comparar la idoneidad de este sistema con el sistema basado en plantas.

En este trabajo las suspensiones se han establecido a partir de los callos obtenidos del tejido foliar de plantas transgénicas, ya que de esa manera evitamos la necesidad de seleccionar el tejido transformado, facilitando y acelerando la obtención de líneas productoras (Hellwig *et al.*, 2004). Alternativamente, las suspensiones pueden establecerse a partir de

5. DISCUSSION

líneas bien establecidas como BY-2, susceptible a la transformación mediante *A. tumefaciens* (Nagata *et al.*, 1992).

La inducción de callos a partir de tejido foliar se ha realizado mediante la adición al medio de cultivo MIC de la auxina sintética 2,4-D. Su utilización para inducir callos sin la necesidad de añadir citoquininas (Witham, 1968) ha sido descrita en otras especies de solanáceas como la patata (Khatun *et al.*, 2003). Este regulador del crecimiento es el más común y efectivo para la inducción de callos sin diferenciación del tejido (Martin-Tanguy *et al.*, 1988), y en ocasiones se emplea para inhibir la organogénesis (Husin *et al.*, 2005). En este trabajo, el 2,4-D ha sido capaz de inducir la formación de callos de textura blanda en menos de un mes, a concentraciones relativamente bajas en comparación con lo empleado por otros autores (Ramírez *et al.*, 2000; Khatun *et al.*, 2003; Min *et al.*, 2006).

Los callos obtenidos han sido transferidos a medios de cultivo suplementados con diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento. En la literatura se ha descrito una gran variedad de medios de cultivo, tanto para la inducción como para el mantenimiento de los callos; ya sea en diferentes especies vegetales, o para una misma variedad de tabaco. En este trabajo se ha optado por los medios MCTA y MCTB descritos para la variedad Xanthi (Negrel *et al.*, 1993; Girard *et al.*, 2006), por el medio MCTC, muy empleado en tabaco, y por el propio medio MIC. Los resultados nos muestran que si bien el medio MIC es capaz de inducir callos blandos, no es capaz de mantenerlos a lo largo de los diferentes subcultivos, al no producirse suficiente proliferación de la masa celular. En este caso, la falta de proliferación podría estar relacionada con la baja concentración de 2,4-D empleada, suficiente para iniciar la proliferación pero no para mantenerla. Otros autores observan una buena proliferación de la masa celular en callos de tabaco cultivados con 0.5 mg l⁻¹ de 2,4-D (Witham, 1968), lo que podría sugerir que tal vez por debajo de esa concentración no se mantiene el efecto proliferativo. El medio de cultivo MCTB, descrito para la variedad Xanthi, (Negrel *et al.*, 1993) no ha resultado ser idóneo para el mantenimiento de los callos pese a tener una mayor concentración de 2,4-D, ya que éstos han mostrado un color marrón y poca proliferación. A diferencia de lo observado en este trabajo, en otras especies, esta combinación de reguladores del crecimiento ha sido la más favorable para el cultivo de callos (Gürel *et al.*, 2001; Haensch, 2007), poniendo de manifiesto las diferencias de respuesta en la misma variedad y entre distintas especies.

Los medios de cultivo MCTA y MCTC han resultado ser los más idóneos para el mantenimiento de los callos, permitiéndonos su almacenamiento y subcultivo a lo largo de un periodo de tiempo superior a un año. Estos callos presentan diferencias morfológicas entre sí

5. DISCUSION

respecto al tamaño, color y textura. Los callos cultivados en el medio MCTA son más grandes que los cultivados en el medio MCTC, de acuerdo con lo observado por otros autores en patata y tabaco (Turhan, 2004; Husin *et al.*, 2005).

Respecto al color y la textura, los callos cultivados en el medio MCTC son más blandos y de un tono amarillo claro translúcido, un dato que concuerda con lo obtenido por otros autores que utilizan 2,4-D (Gopi y Vatsala, 2006) y kinetina (Mucciarelli *et al.*, 2000) en el cultivo de callos de tabaco. Los callos cultivados en el medio MCTC muestran un aspecto más parecido, tanto en color como textura, al de líneas bien establecidas y caracterizadas para el establecimiento de suspensiones celulares que son cultivadas en presencia de 2,4-D (Mayo *et al.*, 2006). Por otro lado, los callos cultivados en el medio MCTA muestran una textura más compacta, menos blanda y de un color blanco opaco. Otros autores han observado que la adición al medio de cultivo de ANA, solo o en combinación con BAP, produce también callos blancos en patata (Khatun *et al.*, 2003). Estos resultados nos sugieren que el color y textura del tejido podría estar relacionado con el crecimiento inducido por las diferentes combinaciones de reguladores.

Tras analizar la morfología de los callos obtenidos, se han caracterizado molecularmente, a nivel transcripcional y de síntesis proteica. Se han analizado los callos cultivados en el medio MCTA, por ser el medio que mayor proliferación celular ha permitido.

Para el análisis de los niveles de transcripción, se han seleccionado los callos derivados de las mismas plantas que habían sido analizadas previamente mediante PCR en tiempo real, para poder estudiar la relación existente entre el tipo de tejido y la actividad transcripcional.

Los resultados muestran que en todos los callos, excepto uno, se produce la transcripción del gen *hPL₃*. Los niveles de mRNA varían entre los clones analizados, tal y como ha ocurrido en las plantas, y de nuevo se ha observado que la relación entre mRNA y proteína solo se correlaciona positivamente en parte de los clones analizados. Sin embargo, a nivel transcripcional si se ha observado una relación directa entre los tipos de tejido; en general, las plantas que mayores niveles de transcripción presentan producen también callos con elevados niveles de transcritos, y viceversa. La excepción a esta observación es un callo que no presenta mRNA del gen *hPL₃*, pese a que la planta que lo originó mostraba un nivel de producción de hPL detectable. En este caso, se podría descartar la pérdida física del transgén debido a que el callo sigue creciendo en presencia de kanamicina, y el diseño del vector nos garantiza la integración del transgén si el gen de selección se encuentra presente en el genoma (Hellens y Mullineaux, 2000). La observación realizada en este trabajo también ha sido

5. DISCUSION

descrita por otros autores en callos de tabaco originados a partir de tejido foliar de plantas transgénicas (Fojtova *et al.*, 2003). Estos autores describen la metilación *de novo* del promotor 35S CaMV, un fenómeno denominado silenciamiento génico transcripcional que tiene como consecuencia la inhibición de la transcripción (Mitsuhara *et al.*, 2002), por lo que no es posible detectar mRNA del transgén. En condiciones de cultivo *in vitro* se ha observado que se produce una sobre-regulación de metiltransferasas y otros modificadores epigenéticos (Tanurdzic *et al.*, 2008). Según los autores, este proceso de metilación podría deberse a un fenómeno producido durante el proceso de inducción, o que podría estar presente en las plantas parentales representando una quimera epigenética. En nuestro caso, la planta es capaz de transcribir el transgén así como de sintetizar la proteína, por lo que la pérdida de expresión en el callo podría atribuirse a un fenómeno de silenciamiento producido durante el proceso de inducción de callo. Estos datos concuerdan con lo observado por De Carvalho *et al.* (1992) en plantas de tabaco, que pese a ser resistentes a kanamicina (antibiótico de selección), no presentan ni mRNA ni proteína recombinante. Los autores proponen también un mecanismo de supresión específico para el cassette “35S CaMV-transgén”, ya que la resistencia a kanamicina no se ve alterada.

Además del fenómeno de silenciamiento génico, que es extensible a cualquier otro evento de inserción genética, los tejidos cultivados *in vitro* son susceptibles de sufrir modificaciones genéticas como consecuencia del tipo de cultivo, dando lugar a la variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981).

El análisis western blot de las proteínas extraídas de los callos cultivados en el medio MCTA ha demostrado que los callos pNEKhPL1 producen una proteína con el peso molecular esperado de 22 kDa, similar al de la proteína hPL comercial. El extracto del callo no transformado, como era de esperar, no ha mostrado señal alguna. Este resultado demuestra que en los callos pNEKhPL1 las células vegetales son capaces de procesar correctamente el péptido señal.

En el caso de los callos pNEKhPL2, tras la inmunodetección con un anticuerpo anti hPL, se ha observado una banda mayoritaria de 22 kDa, la masa molecular esperada para la proteína hPLr, y una segunda banda muy tenue de 24 kDa, la masa molecular esperada para la proteína hPLr fusionada a la cola de histidinas y la secuencia KDEL. La inmunodetección realizada empleando un anticuerpo anti-His ha revelado que la proteína de 24 kDa se correspondería con el hPL fusionado a la cola de histidina. El hecho de que la mayor parte de la proteína detectada en los callos pNEKhPL2 tenga una masa molecular menor a la esperada podría deberse a un procesamiento incorrecto de parte de la proteína, dando lugar a la pérdida

5. DISCUSSION

de parte del extremo carboxilo terminal. El incorrecto procesamiento de proteínas recombinantes también ha sido descrito por otros autores, que observan proteínas de tamaños diferentes a los esperados (Mitra y Zhang, 1994). Un mal plegamiento o la falta de uniones disulfuro apropiadas podrían aumentar las posibilidades de que las proteasas vegetales degraden las proteínas (Doran, 2006b), tal y como se ha observado en otros casos (Sharp y Doran, 2001). Sin embargo, callos de tabaco BY-2 transformados con el vector pNEKhPL2 han sido capaces de producir lactógeno recombinante correctamente procesado y biológicamente activo (Oyanguren, 2009), demostrando que éste es un sistema de producción adecuado. La microsecuenciación de los extremos amino y carboxilo-terminales de la proteína producida en los callos podría dilucidar si la proteína ha sufrido la pérdida de aminoácidos en alguno de sus extremos. Asimismo, sería conveniente analizar la actividad biológica de la proteína producida en los callos pNEKhPL2 para determinar la influencia del tipo de procesamiento en la capacidad mitogénica del hPLr.

Cabe destacar que no se ha observado ninguna reacción inespecífica en el extracto de los callos no transformados, ni en los callos pNEKhPL1 ni en los pNEKhPL2, al contrario de lo que ocurre en los extractos proteicos del tejido foliar. Esta diferencia podría ser debida a los cambios que ocurren a nivel de síntesis, acumulación y degradación de proteínas durante la transición del tejido foliar a callo (Kemp y Sutton, 1972), y al hecho de que el tejido foliar es fotosintético y los callos no.

Los niveles de producción en los callos pNEKhPL1 se encuentran en el rango de lo descrito por otros autores (Mitra y Zhang, 1994; Matsumoto *et al.*, 1995; Blumenthal *et al.*, 1999; James *et al.*, 2000). La producción media de los callos pNEKhPL1 es del 0.6% respecto a la PTS, un valor ligeramente superior al obtenido en callos BY-2 transformados con la misma construcción genética (Oyanguren, 2009). Pese a las ventajas de la línea celular BY-2 en términos de crecimiento y homogeneidad del cultivo, hay autores que obtienen mayores niveles de producción en callos originados a partir de tejido foliar de plantas transgénicas en comparación con callos BY-2 transformados (Fischer *et al.*, 1999b), tal y como se ha observado en este trabajo.

Los niveles obtenidos en callos pNEKhPL2, con un máximo de producción del 1.9% de la PTS, se ajustan a lo obtenido por autores que utilizan vectores derivados del vector pTRAcK (Sorrentino *et al.*, 2005). En otros casos en los que se emplean vectores con el promotor 2x35S CaMV se obtienen valores inferiores a los obtenidos en este trabajo (Fischer *et al.*, 1999c; Sojikul *et al.*, 2003; Schinkel *et al.*, 2005).

5. DISCUSSION

Los resultados de los niveles de producción nos permiten determinar que los callos pNEKhPL2 producen dos veces más hPLr que los callos pNEKhPL1. Tal y como se ha comentado previamente en este trabajo, el diseño del vector de expresión es un factor muy importante a la hora de optimizar los niveles de producción. Probablemente, las secuencias reguladoras empleadas en el vector pNEKhPL2 serían las responsables de esta diferencia en los niveles de producción entre ambos tipos de callos.

En relación con el tipo de tejido, cabe destacar que los callos pNEKhPL1 y pNEKhPL2 producen 4 y 1.7 veces más hPLr que las plantas, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores (Blumenthal *et al.*, 1999; Girard *et al.*, 2006) y se deben, probablemente, a que los callos tienen 6 veces menos cantidad de PTS que el tejido foliar. También se ha observado que las plantas que más hPLr sintetizan no originan los callos con mayores niveles de producción de proteína recombinante, al contrario de lo que se ha observado a nivel transcripcional. En este caso, la elección de una planta con altos niveles de producción de hPLr no nos garantizaría la obtención de un callo muy productivo, tal y como han descrito otros autores al comparar callos y suspensiones celulares (James *et al.*, 2000).

Una vez caracterizados los callos a nivel molecular, se han establecido las suspensiones celulares, para así poder analizar un sistema vegetal alternativo para la producción de hPLr, y compararlo con el sistema basado en plantas. Para ello, se ha optado por aquellos callos que mayor nivel de producción presentaban, teniendo en cuenta también, un buen crecimiento en medio sólido.

En el caso de los callos pNEKhPL2 no ha sido posible establecer una suspensión celular adecuada, debido a la aparición de agregados celulares de gran tamaño. La agregación celular es un fenómeno habitual en las suspensiones debido a que las células no se separan correctamente tras la división celular. La secreción extracelular de polisacáridos, especialmente en las fases finales del crecimiento, puede contribuir a incrementar la adhesión celular (Kieran *et al.*, 1997). Las suspensiones pueden presentar diferentes grados de agregación celular, cuyo tamaño varía dependiendo de la especie vegetal, la fase del crecimiento, y las condiciones de cultivo (Su, 2006). Estos agregados incrementan la heterogeneidad del cultivo, ya que se producen diferentes ambientes para las células que están en el interior del agregado y las que están en el exterior (Taticek *et al.*, 1991). En agregados muy grandes, los nutrientes no alcanzan a las células del interior, lo que puede generar efectos negativos sobre el crecimiento del cultivo y afectar a la cantidad y calidad de las proteínas

5. DISCUSION

recombinantes (Huang *et al.*, 2009). También se ha observado que estos agregados pueden contribuir a un aumento de la viscosidad de las suspensiones, lo que unido a una pobre agitación produce transferencias de masa y oxígeno ineficientes (Taticek *et al.*, 1991). Sin embargo, la aparición de agregados celulares puede ser deseable para la biosíntesis de muchos metabolitos secundarios en suspensiones celulares (Chattopadhyay *et al.*, 2002). La agregación celular promueve la organización celular y la diferenciación, lo que posiblemente favorece la producción de estos compuestos, que tienen muchas aplicaciones en medicina y un alto valor en el mercado (Su, 2006; Huang *et al.*, 2009). Gracias a la tendencia a formar agregados, la producción de metabolitos secundarios puede realizarse en biorreactores de células inmovilizadas (Doran, 1993).

Tal y como se ha comentado anteriormente, las condiciones de cultivo, entre ellas la composición del medio (combinación de reguladores del crecimiento) y la textura de los callos, son determinantes a la hora de obtener una suspensión con unas características favorables para la producción de proteínas recombinantes (Chattopadhyay *et al.*, 2002). Son preferibles aquellos callos que se disgregan fácilmente, de modo que pequeños trozos de callo son transferidos a medio líquido y al ser cultivados en agitación, permiten obtener suspensiones formadas por células individuales o grupos de 2-20 células (Fischer *et al.*, 1999b).

En este trabajo se ha analizado la evolución de las suspensiones pNEKhPL1 ante la imposibilidad de establecer suspensiones a partir de callos pNEKhPL2. Además, en el caso de la construcción pNEKhPL2, la proteína recombinante quedaría retenida, en su mayor parte, en el retículo endoplasmático, haciendo menos eficiente su secreción al medio extracelular. Como se ha comentado previamente, la posibilidad de purificar las proteínas recombinantes a partir del medio de cultivo es una de las características más interesantes que las suspensiones celulares ofrecen.

Los callos pNEKhPL1 seleccionados han mostrado diferentes texturas dependiendo del medio en el que han sido cultivados, el medio MCTA o el MCTC, una característica que se ha trasladado a las suspensiones celulares. Aunque no se han observado agregados celulares tan grandes y numerosos como los observados en las suspensiones de callos pNEKhPL2, tampoco se han obtenido suspensiones celulares completamente homogéneas. Las suspensiones cultivadas en el medio MCTA han mostrado mayor tendencia a la formación de agregados celulares que las suspensiones cultivadas en el medio MCTC, las cuales han sido las más finas y homogéneas. En la mayoría de los trabajos que describen la producción de proteínas recombinantes en suspensiones celulares de tabaco no se hace

5. DISCUSION

mención a la textura de las mismas. Sin embargo, en algunos casos se utilizan medios diferentes para inducir/mantener los callos y para establecer las suspensiones celulares (Harding *et al.*, 1997; Blumenthal *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2006). En estos casos, los callos se cultivan en medios donde los reguladores del crecimiento son ANA/BAP o ANA/kinetina mientras las suspensiones se establecen en medios suplementados con 2,4-D/kinetina o 2,4-D. Berlyn y Zelitch. (1975) también hacen referencia a los reguladores del crecimiento y su efecto sobre la textura de las suspensiones, describiendo suspensiones más finas en presencia de 2,4-D y mayor cantidad de agregados celulares en aquellas cultivadas en medios suplementados con ANA. Girard *et al.* (2006) observan la aparición de agregados celulares en suspensiones cultivadas en el medio MCTA, que además mantienen esa textura en posteriores subcultivos.

La caracterización de las suspensiones celulares se ha realizado mediante la determinación de la biomasa (fresca y seca), la cantidad de PTS (extracelular e intracelular) y la cantidad de hPLr (intracelular y en el medio de cultivo).

El patrón de crecimiento típico de las células vegetales en suspensión consta de las fases de latencia, exponencial y estacionaria. Este crecimiento es similar al de bacterias y levaduras, si bien las células vegetales crecen más despacio y tienen menores requerimientos de oxígeno (Taticek *et al.*, 1991).

La primera diferencia notoria que se ha observado entre las suspensiones cultivadas en el medio MCTA y el medio MCTC es la duración del cultivo. Las suspensiones cultivadas en el medio MCTA han necesitado más tiempo de cultivo para obtener un máximo de biomasa fresca en comparación con las suspensiones cultivadas en el medio MCTC. La duración del cultivo en la suspensión cultivada en el medio MCTA coincide con la descrita por Girard *et al.* (2006) utilizando la misma variedad de tabaco y el mismo medio de cultivo. Estos autores sugieren que la duración del cultivo se debe a que la variedad Xanthi aún no está completamente adaptada al cultivo en suspensión como otras variedades. Por otro lado, la misma variedad requiere menos tiempo de cultivo cuando se emplea el medio MCTC. Este resultado coincide con lo observado por otros autores que utilizan medios similares al MCTC (Hong *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004), por lo que la falta de adaptación aducida por Girard *et al.* (2006) estaría relacionada en mayor medida con el tipo de medio empleado, más que con el tipo de variedad de tabaco utilizada. Además, en este caso en concreto, la diferencia de duración entre ambos tipos de suspensiones celulares podría estar relacionada con la cantidad de inóculo empleada. Aunque todas las suspensiones se han inoculado al 10% (p/v), las diferencias observadas en la textura de ambos tipos de

5. DISCUSION

suspensiones celulares pueden dar lugar a diferencias en las densidades celulares iniciales en las mismas, haciendo que las suspensiones cultivadas en el medio MCTC partan de mayor cantidad de biomasa que las suspensiones cultivadas en el medio MCTA, alargando de esta manera el tiempo necesario para alcanzar el máximo de biomasa.

El crecimiento de las suspensiones transformadas y no transformadas ha sido similar en ambos medios de cultivo, demostrado que la expresión del transgén no influye el crecimiento de las células de tabaco. En ambos tipos de suspensiones, los máximos de biomasa obtenidos están dentro del rango de lo descrito por otros autores (James *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2006).

La evolución de la biomasa fresca de las suspensiones cultivadas en el medio MCTC ha mostrado un crecimiento ligeramente superior en la suspensión transgénica. Esta diferencia podría estar relacionada con la cantidad de células (en PF) inoculadas en la suspensión, o con el estado fisiológico de las mismas, tanto en el inóculo, como en la propia suspensión, debido a que las células pueden encontrarse más o menos sincronizadas en su crecimiento (Nagata y Kumagai, 1999). Por otro lado, los resultados de la evolución de la biomasa seca, nos indican que las diferencias en PF podrían deberse también al contenido intracelular de agua, ya que todas las suspensiones muestran tendencias similares de biomasa seca.

Los máximos de biomasa seca son similares a los obtenidos por otros autores (Lee *et al.*, 2002; Lee y Kim, 2002; Kwon *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004), y se obtienen en periodos de tiempo parecidos en ambos tipos de suspensiones. En las suspensiones cultivadas en el medio MCTC los máximos de biomasa fresca y seca coinciden perfectamente, sin embargo, en las suspensiones cultivadas en el medio MCTA existe un desfase temporal entre ambos máximos. Des Molles *et al.* (1999) también observan un desfase de tiempo entre los máximos de biomasa fresca y seca, aunque no tan acusado como en este caso. A este respecto, se ha observado que una morfología celular alargada puede producir mayores volúmenes de empaquetamiento celular para un peso seco determinado (Huang y McDonald, 2009), de manera que las células aumentan en volumen reteniendo más agua en su interior, y aumentando el peso fresco con el mismo número de células. La elongación celular puede ser alterada mediante los nutrientes del medio de cultivo y la concentración/tipo de reguladores del crecimiento, como el ANA, un regulador capaz de promover la elongación celular (Su, 2006), y presente en el medio de cultivo MCTA. El análisis de las suspensiones cultivadas en el medio MCTA mediante microscopía nos ha permitido observar esta morfología alargada (datos no mostrados).

5. DISCUSSION

Otro de los parámetros analizados para determinar la evolución de las suspensiones ha sido la cantidad de PTS. Intracelularmente, la PTS producida ha sido similar en ambos tipos de suspensiones, alcanzando valores máximos que se encuentran en el rango de lo descrito por otros autores para diferentes variedades de tabaco (Hogue *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2001; Yano *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2006). Extracelularmente, la cantidad máxima de PTS también es similar a la obtenida en otros trabajos (Liu *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Mavituma 2005), habiéndose estimado que las células vegetales secretan entre 100 y 500 mg l⁻¹ de proteínas solubles al medio de cultivo (Huang y McDonald, 2009). Sin embargo, la tendencia de la PTS extracelular es diferente entre ambos tipos de suspensiones. Mientras que la evolución mostrada por las suspensiones cultivadas en el medio MCTC se asemeja más a lo descrito por otros autores (Lee *et al.*, 2004), las suspensiones cultivadas en el medio MCTA muestran una tendencia poco habitual, con una fase constante y un gran incremento al final del cultivo. El aumento de la PTS extracelular podría estar motivado por un proceso de lisis celular, como consecuencia de la falta de nutrientes en las células que forman los agregados (Doran, 1993), cuyo tamaño aumenta a medida que el cultivo progresa. Además, la disminución del peso seco a partir del momento en que comienza a aumentar la PTS puede ser también indicativo de lisis celular (Kieran, 2000).

Finalmente, el análisis de la cantidad de hPLr nos ha permitido observar que los valores obtenidos en las suspensiones cultivadas en los medios MCTA y MCTC están en el rango de lo descrito por otros autores (Liu *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Kwon *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Navarre *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010). Sin embargo, hay que destacar las notables diferencias observadas entre ambos tipos de suspensiones, siendo la cultivada en el medio MCTC la que mayor cantidad de hPLr ha producido, tanto intracelularmente como en el medio de cultivo. En esta suspensión, en la que se ha obtenido un máximo de 280 µg l⁻¹ de hPLr total, se produce 3.5 veces más proteína recombinante que en la suspensión cultivada en el medio MCTA, y además ese máximo se obtiene 7 días antes. El porcentaje de proteína secretada también es superior en la suspensión cultivada en el medio MCTC, alcanzando el 66%, frente a un 37% que se alcanza en la suspensión cultivada en el medio MCTA.

El porcentaje de hPL extracelular en la suspensión cultivada en el medio MCTC se ha mantenido constante a lo largo de todo el periodo de cultivo, confirmando la secreción activa de las células vegetales. En la suspensión cultivada en el medio MCTA, por el contrario, la mayor parte de la proteína ha sido retenida intracelularmente. La capacidad secretora de los cultivos celulares está determinada por varios factores, entre ellos la presencia del péptido-señal y el tamaño de la proteína recombinante. El paso de las proteínas a través de la pared

5. DISCUSSION

celular es uno de los pasos limitantes para la secreción al medio, debido a que los poros pueden variar en tamaño y estructura, limitando el paso de proteínas demasiado grandes (Magnuson *et al.*, 1996). En líneas celulares bien adaptadas al cultivo en suspensión se han observado poros de mayor tamaño permitiendo el paso de proteínas más grandes (James y Lee, 2001). El lactógeno placentario humano es una proteína de 22 kDa, que como se observa en el western blot de la fracción extracelular de ambas suspensiones, es capaz de atravesar la pared y alcanzar el medio de cultivo. Sin embargo, en la suspensión cultivada en el medio MCTA, la proteína es indetectable en el medio de cultivo a partir del 11er día, acumulándose en la fracción intracelular. Otros autores han observado descensos notables en la cantidad de proteína extracelular (Sharp y Doran, 2001; Kwon *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004), y en todos estos casos la desaparición de la proteína está relacionada con la actividad de proteasas presentes en el medio de cultivo. En nuestro caso, el análisis de la actividad proteasa en las muestras extracelulares de la suspensión cultivada en el medio MCTA, revela un incremento de actividad entre los días 12 y 17, coincidiendo con la desaparición de la proteína recombinante. A partir del 17º día de cultivo, la actividad proteasa disminuye hasta el final del cultivo, mientras que la proteína recombinante vuelve a ser detectada en el medio a partir del 20º día de cultivo. La inmunodetección del hPLr nos ha permitido observar, además de la proteína con el tamaño esperado, otra de aproximadamente 20 kDa que podría representar una forma degradada de la proteína.

Por otro lado, la formación de agregados celulares podría también provocar que la proteína quedase retenida en la superficie de los mismos en el momento de ser secretada al medio extracelular, debido a la secreción de polisacáridos, y de esta manera, evitando su detección extracelular. También se ha descrito que la adsorción de las proteínas recombinantes a las paredes del matraz puede producir su desaparición del medio de cultivo (Doran, 2006a), e incluso la interacción de las proteínas con los iones metálicos del medio ha demostrado ser responsable de la disminución en los niveles de proteína extracelular (Tsoi y Doran, 2002).

Algunos de estos efectos negativos sobre los procesos de producción en suspensiones celulares se podrían minimizar mediante la co-expresión de inhibidores de proteasa (Kim *et al.*, 2008), o su adición directa al medio de cultivo. Inhibidores de proteasa como la bacitracina han permitido aumentar la cantidad de proteínas recombinantes en el medio de cultivo (Lee *et al.*, 2003). Por otro lado, el uso de agentes osmóticos que evitan la rotura celular (Doran, 2006b), como por ejemplo, el polietilen glicol, también han demostrado ser

5. DISCUSION

efectivos para la producción de proteínas recombinantes en suspensiones celulares (Lee y Kim, 2002).

Las suspensiones celulares representan un sistema idóneo para producir multitud de proteínas, y la posibilidad de purificarlas a partir del medio de cultivo las hace muy atractivas para reducir los costes de producción. Además, el uso de biorreactores posibilita la optimización del cultivo para obtener grandes cantidades del producto de interés. La tecnología de biorreactores tiene el inconveniente de que requiere una inversión económica fuerte y un personal adecuado (Twyman *et al.*, 2005). Si embargo, en los últimos años los biorreactores desechables se han ido introduciendo en la producción de moléculas terapéuticas a escala preclínica y clínica. Estos equipos son muy variados, flexibles y reducen costes económicos y la incidencia de contaminaciones (Eibl *et al.*, 2010).

Cuando se comparan los sistemas basados en plantas y los basados en suspensiones para producir la misma proteína, en general, las plantas transgénicas alcanzan niveles de expresión superiores (Fischer *et al.*, 1999c; Gao *et al.*, 2004; Schiermeyer *et al.*, 2005; Schinkel *et al.*, 2005). En este trabajo, las plantas producen más hPLr (0.42% de la PTS) que las suspensiones celulares, cuyo nivel máximo de producción es del 0.16% respecto a la PTS. Algunos autores sugieren que esto podría deberse a un efecto de dilución de la proteína en un volumen relativamente grande (Lee *et al.*, 2002), o bien a la pérdida de la misma debido a su adsorción y/o degradación en el medio de cultivo, tal y como se ha comentado anteriormente.

La diabetes es una enfermedad ampliamente extendida que genera grandes complicaciones de salud, y también enormes gastos médicos. La posibilidad de abordar el tratamiento de esta enfermedad mediante el trasplante de tejido pancreático ha abierto una nueva posibilidad para un gran número de personas que conviven con la dependencia a la insulina. La gran demanda de tejido pancreático, genera a su vez, una gran demanda de los factores de crecimiento que se barajan como agentes proliferantes de ese tejido, entre ellos el lactógeno placentario. Desde un punto de vista de la producción de esta proteína, y teniendo en cuenta la enorme demanda que tendría, las plantas se presentan como un sistema adecuado, entre los organismos vegetales, gracias a sus mayores niveles de producción, menores costes económicos y enorme potencial de escalado. Por su parte, las suspensiones pueden tener mayor margen de mejora de la producción gracias al uso de biorreactores, líneas celulares bien adaptadas al cultivo en medio líquido, esquemas más baratos de purificación y menores complicaciones legales. No debemos olvidar que la principal ventaja de las plantas, su escalabilidad, se encuentra limitada por problemas de legislación y análisis de riesgos, por lo

5. DISCUSION

que el cultivo en biorreactores podría ser la alternativa más adecuada. A este respecto, el trabajo realizado por Oyanguren. (2009) representa un punto de partida importante para seguir analizando la mejor estrategia de producción de lactógeno humano en biorreactores, mediante la optimización de los parámetros de cultivo previamente establecidos, y aprovechando la versatilidad que ofrecen estos equipamientos.

Los menores niveles de producción que se obtienen en las suspensiones se pueden mejorar mediante diferentes estrategias. Además del uso de agentes estabilizadores, la optimización de las condiciones de cultivo como la aireación, el volumen de cultivo, la edad del inóculo (Liu y Lee, 1991), o el diseño de cultivo en biorreactor (Lee *et al.*, 2004) pueden aumentar la cantidad de proteína recombinante. La fusión de proteínas puede mejorar la estabilidad de las proteínas recombinantes (Xu *et al.*, 2010), mientras que la utilización de promotores inducibles, es una estrategia muy adecuada al permitir obtener grandes densidades celulares antes de inducir la síntesis de las proteínas recombinantes (Choi *et al.*, 2003). Además, de esta manera se evita la acción de las proteasas del medio de cultivo (Hong *et al.*, 2006). Cualquiera de estas estrategias podría suponer una mejora importante de la producción de hPLr en suspensiones celulares, permitiendo la obtención de la proteína de forma más barata y segura.

La versatilidad de los organismos vegetales representa un punto a favor importante para un sistema de producción, que como se ha comentado a lo largo de este trabajo, tiene muchas ventajas respecto a otros. Los resultados aquí mostrados nos demuestran que tanto las plantas como las células en suspensión son capaces de producir lactógeno placentario humano de forma correcta. La idoneidad de un sistema u otro dependerá de la demanda del producto, los costes económicos de producción, la pureza requerida, etc. Factores todos ellos que requieren de un estudio en profundidad antes de abordar la producción de lactógeno placentario humano a escala comercial.

Gracias a la posibilidad de alternar ambos sistemas, podemos decir que la producción de lactógeno tiene en los sistemas vegetales (plantas y células en suspensión) una fuente de producción alternativa, en principio, más barata y segura que los sistemas convencionales.

La producción de moléculas terapéuticas en organismos vegetales tiene ya más de 20 años de historia. A lo largo de estos años, los esfuerzos en investigación han dado como resultado más de 600 publicaciones originales y alrededor de 100 familias de patentes (Faye y Gomord, 2010). Se han creado multitud de empresas y se han producido infinidad de moléculas, y con un pequeño esfuerzo más por parte de todos los agentes implicados, los

5. DISCUSION

productos producidos en organismos vegetales podrían alcanzar el mercado en igualdad de condiciones que los productos producidos en sistemas convencionales, para beneficio de toda la sociedad.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha clonado el cDNA del *lactógeno placentario humano* mediante RT-PCR y se ha introducido en el genoma de *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi mediante el método de cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*.
2. El vector pNEKhPL2, optimizado para la producción mediante diferentes secuencias reguladoras, ha permitido obtener un máximo de hPLr del 1% de la cantidad de PTS, incrementado 4.8 veces la cantidad de proteína respecto a la construcción pNEKhPL1.
3. La proteína hPLr producida en plantas de tabaco mantiene intacta su capacidad terapéutica para el tratamiento de la diabetes tipo 1, mediante la activación de la ruta señalizadora JAK2/STAT5 y la inducción de la proliferación en cultivos de células β .
4. La inclusión de la secuencia His-tag en el extremo carboxilo-terminal del hPLr permite purificar la proteína de forma rápida y sencilla, sin interferir en su actividad biológica.
5. El hPLr se mantiene estable en la planta a lo largo de tres meses de cultivo en invernadero bajo condiciones óptimas de crecimiento, permitiendo su cosechado a lo largo de todo el periodo de cultivo.
6. El transgén es correctamente transmitido a la progenie analizada, obteniendo niveles de producción ligeramente superiores a los de los transformantes primarios.
7. Se han obtenido callos transgénicos a partir de tejido foliar de plantas transgénicas, disminuyendo la concentración de 2,4-D a 0.2 mg l^{-1} .
8. El medio de cultivo MCTC ha sido más adecuado que el MCTA para el establecimiento de suspensiones celulares, permitiendo obtener hasta $280 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ de hPL total, de los cuales el 66% es secretado al medio extracelular.
9. Las plantas pNEKhPL1 producen 2.5 veces más hPLr que las suspensiones celulares, cuyo nivel máximo de producción alcanza el 0.16% de la PTS.
10. Los organismos vegetales, tanto plantas como suspensiones celulares, son capaces de producir hPLr correctamente, representando una fuente alternativa de producción para un futuro tratamiento de la diabetes.

7. ANEXOS

7.1. Anexo I

Secuencia de aminoácidos de la proteína hPL codificada por los genes *hPL₃* y *hPL₄*. La parte subrayada se corresponde con el péptido señal.

```
hPL3 (1) MAAGSRTSLLLFALLCLPWLQEAGAVQTVPLSRLFDHAMLQAHRAHQLAIDTYQEFEEET
hPL4 (1) MAAGSRTSLLLFALLCLPWLQEAGAVQTVPLSRLFDHAMLQAHRAHQLAIDTYQEFEEET

hPL3 (61) YIPKDQKYSFLHDSQTSFCFSDSIPTPSNMEETQOKSNLELLRISLLLIESWLEPVRFRLR
hPL4 (61) YIPKDQKYSFLHDSQTSFCFSDSIPTPSNMEETQOKSNLELLRISLLLIESWLEPVRFRLR

hPL3 (121) SMFANNLVYDTSDDDYHLLKDLLEEGIQTLMGRLEDGSRRTGQILKQTYSKFDTNSHNHD
hPL4 (121) SMFANNLVYDTSDDDYHLLKDLLEEGIQTLMGRLEDGSRRTGQILKQTYSKFDTNSHNHD
                                                218

hPL3 (181) ALLKNYGLLYCFRKMDKQVETFLRMVQCRSVEGSCGF*
hPL4 (181) ALLKNYGLLYCFRKMDKQVETFLRMVQCRSVEGSCGF*
```

7.2. Anexo II

Alineamiento de las secuencias codificantes de los genes que forman parte del cluster *hPL/hGH*. *hGH-V*, hormona del crecimiento placentaria; *hPL₁* pseudogen *hPL*; *hPL₃* y *hPL₄* lactógeno placentario humano.

```
hGH-V (1) ATGGCTGCAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTGGCCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGTCCTGG
hPL1 (1) ATGGCTGCAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTGGCCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGTCCTGG
hPL3 (1) ATGGCTGCAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTGGCCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGTCCTGG
hPL4 (1) ATGGCTCCAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTGGCCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGTCCTGG

hGH-V (61) CTTCAAGAGGGCAGTGCCTTCCCAACCAATTCCCTTATCCAGGCTTTTTGACAACGCTATG
hPL1 (61) CTTCAAGAGGGCTGGTGCCGTCCAAACCGTTCCCTTATCCAGGCTTTTTAAAGAGGCTATG
hPL3 (61) CTTCAAGAGGGCTGGTGCCGTCCAAACCGTTCCCTTATCCAGGCTTTTTGACCACGCTATG
hPL4 (61) CTTCAAGAGGGCTGGTGCCGTCCAAACCGTTCCCTTATCCAGGCTTTTTGACCACGCTATG

hGH-V (121) CTCCGCGCCCGTTCGCTGTACCAGCTGGCATTGACACCTATCAGGAGTTTGAAGAAGCC
hPL1 (121) CTCCAAGCCCATCGCGCACACCAGCTGGCCATTGACACCTACCAGGAGTTTGAAGAAGCC
hPL3 (121) CTCCAAGCCCATCGCGCGCACACCAGCTGGCCATTGACACCTACCAGGAGTTTGAAGAAGCC
hPL4 (121) CTCCAAGCCCATCGCGCGCACACCAGCTGGCCATTGACACCTACCAGGAGTTTGAAGAAGCC

hGH-V (181) TATATCCTGAAGGAGCAGAAGTATTCATTCCTGCAGAACCCAGACCTCCCTCTGCTTC
hPL1 (181) TATATCACAAGGAACAGAAGTATTCATTCCTGCATGACTCCCAGACCTCCTTCTGCTTC
hPL3 (181) TATATCCCAAAGGACCAGAAGTATTCATTCCTGCATGACTCCCAGACCTCCTTCTGCTTC
hPL4 (181) TATATCCCAAAGGACCAGAAGTATTCATTCCTGCATGACTCCCAGACCTCCTTCTGCTTC

hGH-V (241) TCAGAGTCTATTCCAACACCTTCCAACAGGGTGAAAACGCAGCAGAAATCTAACCTAGAG
hPL1 (241) TCAGACTCTATTCCGACATCCTCCAACATGGAGGAAAACGCAGCAGAAATCCAACCTAGAG
hPL3 (241) TCAGACTCTATTCCGACACCTTCCAACATGGAGGAAAACGCAGCAGAAATCCAATCTAGAG
hPL4 (241) TCAGACTCTATTCCGACACCTTCCAACATGGAGGAAAACGCAGCAGAAATCCAATCTAGAG

hGH-V (301) CTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCATGGCTGGAGCCCGTGCAGCTCCTCAGG
hPL1 (301) CTGCTCCACATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCATGGCTGGAGCCCGTGCAGCTCCTCAGG
```

7. ANEXOS

```
hPL3 (301) CTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCGAGTCGTGGCTGGAGCCCGTGC GGTTTCCTCAGG
hPL4 (301) CTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCGAGTCGTGGCTGGAGCCCGTGC GGTTTCCTCAGG

hGH-V (361) AGCGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTATGGCGCCTCGGACAGCAACGTCTATCGCCACCTG
hPL1 (361) AGTACCTTCACCAACAACCTGGTGTATGACACCTCGGACAGCGATGACTATCACCTCCTA
hPL3 (361) AGTATGTTTCGCCAACAACTGGTGTATGACACCTCGGACAGCGATGACTATCACCTCCTA
hPL4 (361) AGTATGTTTCGCCAACAACTGGTGTATGACACCTCGGACAGCGATGACTATCACCTCCTA

hGH-V (421) AAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGTGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGG
hPL1 (421) AAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAATGCTGATGGGGAGGCTGGAAGACGGCAGCCACCTG
hPL3 (421) AAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGACGGCAGCCCGCGG
hPL4 (421) AAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGACGGCAGCCCGCGG

hGH-V (481) ACTGGGCAGATCTTCAATCAGTCTACAGCAAGTTTGACACAAAATCGCACAAACGATGAC
hPL1 (481) ACTGGGCAGACCTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTTGACACAAAATCGCACAAACGATGAC
hPL3 (481) ACTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTTGACACAAAATCGCACAAACGATGAC
hPL4 (481) ACTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTTGACACAAAATCGCACAAACGATGAC

hGH-V (541) GCACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAG
hPL1 (541) GCACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCTCCACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAG
hPL3 (541) GCACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAG
hPL4 (541) GCACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAG

hGH-V (601) ACATTCCCTGCGCATGGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAG
hPL1 (601) ACATTCCCTGCGCATGGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAG
hPL3 (601) ACATTCCCTGCGCATGGTGCAGTGCCGCTCTGTAGAGGGTAGCTGTGGCTTCTAG
hPL4 (601) ACATTCCCTGCGCATGGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAG
```

7.3. Anexo III

Secuencia nucleotídica del gen *hPL₃* clonado en los vectores de expresión pNEKhPL1 y pNEKhPL2. La zona subrayada se corresponde con el péptido señal.

```
>ATGGCTGCAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTGGCTTTTGGCCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGGCTGG
TGCCGTCCAAACCGTTCCGTTATCCAGGCTTTTTGACCACGCTATGCTCCAAGCCCATCGCGGCACCAGCTGGC
CATTGACACCTACCAGGAGTTTGAAGAAACCTATATCCCAAAGGACCAGAAGTATTCATTCTGCATGACTCCCA
GACCTCCTTCTGCTTCTCAGACTCTATTCCGACACCCCTCCAACATGGAGGAAACGCAACAGAAATCCAATCTAGA
GCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCGAGTCGTGGCTGGAGCCCGTGC GGTTTCCTCAGGAGTATGTTCCGCAA
CAACCTGGTGTATGACACCTCGGACAGCGATGACTATCACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCT
GATGGGGAGGCTGGAAGACGGCAGCCGCCGACTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTTGACACAAA
CTCACACAACCATGACGCACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGA
GACATTCTGCGCATGGTGCAGTGCCGCTCTGTAGAGGGTAGCTGTGGCTTCTAG
```

8. BIBLIOGRAFIA

- Allen GC, Hall GE, Childs LC, Weissinger AK, Spiker S, Thompson W.F (1993) Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells. *Plant Cell* 5:603-613
- Allen GC, Hall GE, Michalowski S, Newman W, Spiker S, Weissinger AK, Thompson WF (1996) High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *Plant Cell* 8:899-913
- Allen GC, Spiker S, Thompson WF (2000) Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol Biol* 43:361-376
- Almquist KC, McLean MD, Niu Y, Byrne G, Olea-Popelka FC, Murrant C, Barclay J, Hall JC (2006) Expression of an anti-botulinum toxin A neutralizing single-chainFv recombinant antibody in transgenic tobacco. *Vaccine* 24:2079-2086
- An G (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 79:568-570
- Arlen PA, Falconer R, Cherukumilli S, Cole A, Cole AM, Oishi KK, Daniell H (2007) Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- α 2b. *Plant Biotechnol J* 5(4):511-525
- Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Exp Purif* 48:1-13
- Avesani L, Falorni A, Tornielli GB, Marusic C, Porceddu A, Polverari A, Faleri C, Calcinaro F, Pezzoti M (2002) Improved in planta expression of the human islet autoantigen glutamic acid decarboxylase (GAD65). *Transgenic Res* PC-1157:1-9
- Bae TW, Park HR, Kwak YS, Lee HY, Ryu SB (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of a medicinal plant *Taraxacum platycarpum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 80:51-57
- Bakker H, Bardor M, Molthoff JW, Gomord V, Elbers I, Stevens LH, Jordi W, Lommen A, Faye L, Lerouge P, Bosch D (2001) Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc Nat Acad Sci USA* 98:2899-2904
- Barrera-Saldaña HA, Robberson DL, Saunders GF (1982) Transcriptional products of the human placental lactogen gene. *J Biol Chem* 257(20):12399-13404

8. BIBLIOGRAFIA

- Barrera-Saldaña HA, Seeburg PH, Saunders GF (1983) Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone. *J Biol Chem* 258(6):3787-3793
- Benchabane M, Goulet C, Rivard D, Faye L, Gomord V, Michaud D (2008) Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnol J* 6:633-648
- Benfey PN, Ren L, Chua N-H (1990) Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J* 9: 1677-1684
- Berlyn MB, Zelitch I (1975) Photoautotrophic growth and photosynthesis in tobacco callus cells. *Plant Physiol* 56:752-756
- Bhullar S, Datta S, Advani S, Chakravarthy S, Gautam T, Pental D, Burma PK (2007) Functional analysis of cauliflower mosaic virus 35S promoter: re-evaluation of the role of subdomains B5, B4 and B2 in promoter activity. *Plant Biotechnol J* 5:696-708
- Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Willmitzer L, Müller M (2003) Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virol* 77(17):9211-9220
- Blais DR, Altosaar I (2006) Human CD14 expressed in seeds of transgenic tobacco displays similar proteolytic resistance and bioactivity with its mammalian-produced counterpart. *Transgenic Res* 15:151-164
- Block H, Kubicek J, Labahn J, Roth U, Schäfer F (2008) Production and comprehensive quality control of recombinant human Interleukin-1: A case study for a process development strategy. *Protein Exp Purif* 57:244-254
- Blumenthal A, Kuznetsova L, Edelbaum O, Raskin V, Levy M, Sela I (1999) Measurement of green fluorescence protein in plants: quantification, correlation to expression, rapid screening and differential gene expression. *Plant Sci* 142:93-99
- Bodeutsch T, James EA, Lee JM (2001) The effect of immobilization on recombinant protein production in plant cell culture. *Plant Cell Rep* 20:562-566
- Boguszewski CL, Svensson P-A, Jansson T, Clark R, Carlsson LMS, Carlsson B (1998) Cloning of two novel growth hormone transcripts expressed in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2878-2885
- Bortesi L, Rossato M, Schuster F, Raven N, Stadlmann J, Avesani L, Falorni A, Bazzoni F, Bock R, Schillberg S, Pezzotti M (2009) Viral and murine interleukin-10 are correctly processed and retain their biological activity when produced in tobacco. *BMC Biotechnol* 9:22

8. BIBLIOGRAFIA

- Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG, Sorenson RL (1993) Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet β -cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology* 132:879-887
- Breyne P, Van Montagu M, Depicker A, Gheysen G (1992) Characterization of a plant scaffold attachment region in a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco. *Plant Cell* 4:463-471
- Callis J (1995) Regulation of protein degradation. *Plant Cell* 7:845-857
- Castañón S, Marín MS, Martín-Alonso JM, Boga JA, Casais R, Humara JM, Ordás RJ, Parra F (1999) Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* 73:4452-4455
- Castañón S, Martín-Alonso JM, Marín MS, Boga JA, Alonso P, Parra F, Ordás RJ (2002) The effect of the promoter on expression of VP60 gene from rabbit hemorrhagic disease virus in potato plants. *Plant Sci* 162:87-95
- Cebrian A, García-Ocaña A, Takane KK, Sipula D, Stewart AF, Vasavada RC (2002) Overexpression of Parathyroid Hormone-Related Protein inhibits pancreatic β cell death in vivo and in vitro. *Diabetes* 51:3003-3013
- Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E (2008) β -cell failure as a complication of diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 9:329-343
- Chattopadhyay S, Farkya S, Srivastava AK, Bisaria VS (2002) Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnol Bioprocess Eng* 7:138-149
- Chen TL, Lin YL, Yang NS, Chan MT (2004) Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures. *Transgenic Res* 13:499-510
- Cheon BY, Kim HJ, Oh KH, Bahn SC, Ahn JH, Choi JW, Ok SH, Bae JM, Shin JS (2004) Overexpression of human erythropoietin (EPO) affects plant morphologies: retarded vegetative growth in tobacco and male sterility in tobacco and *Arabidopsis*. *Transgenic Res* 13: 541-549
- Choi SM, Lee OK, Kwon SY, Kwak SS, Yu DY, Lee HS (2003) High expression of a human lactoferrin in transgenic tobacco cell cultures. *Biotechnol Lett* 25:213-218.
- Chrispeels MJ, Herman EM (2000) Endoplasmic reticulum-derived compartments function in storage and as mediators of vacuolar remodeling via a new type of organelle, precursor protease vesicles. *Plant Physiol* 123:1227-1233

8. BIBLIOGRAFIA

- Commandeur U, Twyman RM, Fischer R (2003) The biosafety of molecular farming in plants. *AgBiotechNet* 5:1-9
- Conley AC, Jevnikar AM, Menassa R, Brandle JE (2010) Temporal and spatial distribution of erythropoietin in transgenic tobacco plants. *Transgenic Res* 19(2):291-298
- Conrad U, Fiedler U (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol Biol* 38: 101–109
- Cozar-Castellano I, Weinstock M, Haught M, Velázquez-García S, Sipula D, Stewart AF (2006) Evaluation of β -cell replication in mice transgenic for hepatocyte growth factor and placental lactogen. *Diabetes* 55:70-77
- Dall T, Mann SE, Zhang Y, Martin J, Chen Y, Hogan P (2008) Economic costs of Diabetes in the U.S. in 2007. *Diabetes* 31:1-20
- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* 6:219-226
- De Carvalho F, Gheysen G, Kushnir S, Van Montagu M, Inzé D, Castresana C (1992) Suppression of β -1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J* 11(7):2595-2602
- Decker EL, Reski R (2007) Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals. *Curr Opin Biotechnol* 18:393–398
- Des Molles DV, Gomord V, Bastin M, Faye L, Courtois D (1999) Expression of a carrot invertase gene in tobacco suspension cells cultivated in batch and continuous culture conditions. *J Biosci Bioeng* 87(3):302-306.
- Díaz JA, Vara E, Balibrea JL (2001) Últimos avances en el campo del trasplante de islotes de Langerhans. *Cir Esp* 70:310-313
- Doran PM (1993) Design of Reactors for Plant Cells and Organs. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 48:115-168
- Doran PM (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol* 11:199-204
- Doran PM (2006a) Loss of secreted antibody from transgenic plant tissue cultures due to surface adsorption. *J Biotechnol* 122:39-54
- Doran PM (2006b) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnol* 24(9):426-432

8. BIBLIOGRAFIA

- Ehsani P, Meunier A, Nato F, Jafari A, Nato A, Lafaye P (2003) Expression of anti human IL-4 and IL-6 scFvs in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol* 52:17-29
- Eibl R, Kaiser S, Lombriser R, Eibl D (2010) Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 86(1):41-49
- Elbers IJW, Stoopen GM, Bakker H, Stevens LH, Bardor M, Molthoff JW, Jordi W, Bosch D, Lommen A (2001) Influence of growth conditions and developmental stage on *N*-glycan heterogeneity of transgenic immunoglobulin G and endogenous proteins in tobacco leaves. *Plant Physiol* 126:1314–1322
- Ellgaard L, Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmatic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:181-191
- Farrán I (2000) Producción de albúmina humana en tubérculos de plantas transgénicas de patata (*Solanum tuberosum* L.). Tesis doctoral
- Farrán I, Río-Manterola F, Íñiguez M, Gárate S, Prieto J, Mingo-Castel AM (2008) High-density seedling expression system for the production of bioactive human cardiotrophin-1, a potential therapeutic cytokine, in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J* 6:516-527
- Faye L, Boulaflous A, Benchabane M, Gomord V, Michaud D (2005) Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* 23:1770-1778
- Faye L, Gomord V (2010) Success stories in molecular farming-a brief overview. *Plant Biotechnol J* 8:525-528
- Fernández-San Millán A, Farrán I, Molina A, Mingo-Castel AM, Veramendi J (2007) Expression of recombinant proteins lacking methionine as N-terminal amino acid in plastids: Human serum albumin as a case study. *J Biotechnol* 127:593-604
- 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 Biotechnol J* 1:71-79
- Fernández-San Millán A, Ortigosa SM, Hervás-Stubbs S, Corral-Martínez P, Seguí-Simarro JM, Gaétan J, Coursaget P, Veramendi J (2008) Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol J* 6:427-441
- Fiedler U, Phillips J, Artsaenko O, Conrad U (1997) Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology* 3:205-216

8. BIBLIOGRAFIA

- Finnegan J, McElroy D (1994) Transgene inactivation: plants fight back!. *Bio/Technology* 12:883-888
- Fischer R, Drossard J, Commandeur U, Schillberg S, Emans N (1999a) Towards molecular farming in the future: moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:101–108
- Fischer R, Emans N (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res* 9:279-299
- Fischer R, Emans N, Schillberg S (2001) Achieving plant disease resistance by antibody expression. *Can J Plant Pathol* 23:236–245
- Fischer R, Emans N, Schuster F, Hellwig S, Drossard J (1999b) Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:109–112
- Fischer R, Emans N, Twyman RM, Schillberg S (2004a) Molecular Farming in Plants: Technology Platforms. In: Dekker M (ed) *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. Marcel Dekker Inc, New York, pp 753-756
- Fischer R, Schumann D, Zimmermann S, Drossard J, Sack M, Schillberg S (1999c) Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *Eur J Biochem* 262:810-816
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM (2004b) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* 7:152–158
- Fleenor D, Petryk A, Driscoll P, Freemark M (2000) Constitutive expression of placental lactogen in pancreatic β cells: effects on cell morphology, growth, and gene expression. *Pediatric Res* 47:136-142
- Fojtova M, Van Houdt H, Depicker A, Kovarik A (2003) Epigenetic switch from posttranscriptional to transcriptional silencing is correlated with promoter hypermethylation. *Plant Physiol* 133:1240-1250
- Fujinaka Y, Takane K, Yamashita H, Vasavada RC (2007) Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and BCL-X_L upregulation. *J Biol Chem* 282:30707-30717
- Gallie DR, Lucas WJ, Walbot W (1989) Physiologists visualizing mRNA expression in plant protoplasts: factors influencing efficient mRNA uptake and translation. *Plant Cell* 1:301-311
- Gallie DR, Walbot V (1992) Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucleic Acids Res* 20(17):4631-4638

8. BIBLIOGRAFIA

- Gao J, Hooker BS, Anderson DB (2004) Expression of functional human coagulation factor XIII A-domain in plant cell suspensions and whole plants. *Protein Expr Purif* 37:89-96
- García-Ocaña A, Vasavada RC, Cebrián A, Reddy V, Takane KK, López-Talavera JC, Stewart AF (2001a) Transgenic overexpression of hepatocyte growth factor in the β cell markedly improves islet function and islet transplant outcomes in mice. *Diabetes* 50:2752–2762
- García-Ocaña A, Vasavada RC, Takane KK, Cebrián A, López-Talavera JC, Stewart AF (2001b) Using β -cell growth factors to enhance human pancreatic islet transplantation. *J Clin Endocrinol Metab* 86(3):984-988
- Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(1):16–37
- Gerlach JQ, Kilcoyne M, McKeown P, Spillane C, Joshi L (2010) Plant-produced biopharmaceuticals. In: Kole C et al (eds.) *Transgenic crop plants*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany
- Gils M, Kandzia R, Marillonet S, Klimyuk V, Gleba Y (2005) High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnol J* 3:613-620
- Girard LS, Bastin M, Courtois D (2004) Expression of the human milk protein sCD14 in tobacco plant cell culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 78:253-260
- Girard LS, Fabis MJ, Bastin M, Courtois D, Pétiard V, Koprowski H (2006) Expression of a human anti-rabies virus monoclonal antibody in tobacco cell culture. *Biochem Biophys Res Commun* 345:602-607.
- Gleba D, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Kneer R, Poulev A, Skarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba YY, Raskin I (1999) Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc Nat Acad Sci USA* 96:5973–5977
- Goldstein DA, Thomas JA (2004) Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Q J Med* 97:705–716
- Gomord V, Faye L (2004) Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol* 7:171–181
- Gomord V, Sourrouille C, Fitchette AC, Bardor M, Pagny S, Lerouge P, Faye L (2004) Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnol J* 2:83–100

8. BIBLIOGRAFIA

- Gopi C, Vatsala TM (2006) *In vitro* studies on effects of plant growth regulators on callus and suspension culture biomass yield from *Gymnema sylvestre* R.Br. Afr J Biotechnol 5(12):1215-1219
- Gürel S, Gürel E, Kaya Z (2001) Callus development and indirect shoot regeneration from seedling explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured in vitro. Turk J Bot 25:25-33
- Gutiérrez-Ortega A, Sandoval-Montes C, Olivera-Flores T, Santos-Argumedo L, Gomez-Lim A (2005) Expression of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants. Transgenic Res 14:877-885
- Haensch K-T (2007) Influence of 2,4-D and BAP on callus growth and the subsequent regeneration of somatic embryos in long-term cultures of *Pelargonium x domesticum* cv. Madame Layal. Electron J Biotechnol 10(1)15
- Halweg C, Thompson WF, Spikera S (2005) The Rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: a flow cytometric study. Plant Cell 17:418–429
- Han KH, Ma C, Strauss SH (1997) Matrix attachment regions (MARs) enhance transformation frequency and transgene expression in poplar. Transgenic Res 4:415-420
- Harding SA, Oh S-H, Roberts DM (1997) Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. EMBO J 16(6):1137-1144
- Hazarika BN (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. Sci Hortic 108:105–120
- Hellens R, Mullineaux P, Klee H (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors Trends Plant Sci 5(10):446-451
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. Nature Biotechnol 22(11):1415-1422
- Hochuli E (1992) Purification techniques for biological products. Pure and Appl Chem 64(1):169-184
- Hogue RS, Lee JM, An G (1990) Production of foreign protein product with genetically modified plant cells. Enzyme Microb Technol 12(7):533-538
- Hong S-Y, Kwon T-H, Jang Y-S, Kim S-H, Yang M-S (2006) Production of bioactive human granulocyte-colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension cultures. Prot Expres Purif 47:68–73

8. BIBLIOGRAFIA

- Hong SY, Kwon TH, Lee JH, Jang YS, Yang MS (2002) Production of biologically active hG-CSF by transgenic plant cell suspension culture. *Enzyme Microb Technol* 30:763-767
- Hood E (2002) From green plants to industrial enzymes. *Enzyme Microb Technol* 30:279-283
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231
- Howard JA (2005) Commercialization of biopharmaceutical and bioindustrial proteins from plants. *Crop Sci* 45:468-472
- Huang T-K, McDonald KA (2009) Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochem Eng J* 45:168–184
- Huang T-K, Plesha MA, Falk BW, Dandekar AM, McDonald KA (2009) Bioreactor strategies for improving production yield and functionality of a recombinant human protein in transgenic tobacco cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 102:508–520
- Hüns M, Neuman K, Hausmann T, Ziegler K, Kleme F, Kahmann U, Staiger D, Lockau W, Pistorius EK, Broer I (2008) Plastid targeting strategies for cyanophycin synthetase to achieve high-level polymer accumulation in *Nicotiana tabacum*. *Plant Biotechnol J* 6:321-336
- Huffaker RC (1990) Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytol* 116:199-231
- Humara JM, Ordás RJ (1999) The toxicity of antibiotics and herbicides on in vitro adventitious shoot formation on *Pinus pinea* L. cotyledons. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 35:339-343
- Hunter CV, Tiley LS, Sang HM (2005) Developments in transgenic technology: applications for medicine. *Trends Mol Med* 11(6):293-298
- Husin MAG, Hasan M, Taha RM (2005) Callus induction from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf explants for the production of quinone. *Dev Chem Eng Mineral Process* 13:563-572
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1):23-28
- James E, Lee JM (2001) The production of foreign proteins from genetically modified plant cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 72:1-156
- James EA, Wang C, Wang Z, Reeves R, Shin JH, Magnuson NS, Lee JM (2000) Production and Characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expr Purif* 19:131-138

8. BIBLIOGRAFIA

- Joshi L, Lopez LC (2005) Bioprospecting in plants for engineered proteins. *Curr Opin Plant Biol* 8:223-226
- Judge NA, Mason HS, O'Brien AD (2004) Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. *Infect Immun* 72(1):168-175
- Kadlecěk P, Tichá I, Haisel D, Capkova V, Schäfer C (2001) Importance of in vitro pretreatment for ex vitro acclimatization and growth. *Plant Sci* 161:695-701
- Kamenarova K, Abumhadi N, Gecheff K, Atanassov A (2005) Molecular farming in plants: An approach of agricultural biotechnology. *J Cell Mol Biol* 4:77-86
- Kang TJ, Kwon TH, Kim TG, Loc NH, Yang MS (2003) Comparing constitutive promoters using CAT activity in transgenic tobacco plants. *Mol Cells* 16(1):117-122
- Kang TJ, Loc NH, Jang MO, Yang MS (2004) Modification of the cholera toxin B subunit coding sequence to enhance expression in plants. *Mol Breed* 13:143-153
- Kay R, Chan A, Daly M, McPherson J (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236:1299-1302
- Kemp JD, Sutton DW (1972) Protein metabolism in cultured plant tissues. *Plant Physiol* 49:596-601
- Kermode AR (2006) Plants as factories for production of biopharmaceutical and bioindustrial proteins: lessons from cell biology. *Can J Bot* 84:679-694
- Khatun N, Bari MA, Islam R, Huda S, Siddique NA, Rahman MH, Mollah MU (2003) Callus induction and regeneration from nodal segment of potato cultivar diamant. *J Biol Sci* 3(12):1101-1106
- Kieran PM, MacLoughlin PF, Malone DM (1997) Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J Biotechnol* 59:39-52
- Kieran PM, Malone DM, MacLoughlin PF (2000) Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 67:1-177
- Kim T-G, Lee H-J, Jang Y-S, Shin Y-J, Kwon T-H, Yang M-S (2008) Co-expression of proteinase inhibitor enhances recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor production in transgenic rice cell suspension culture. *Prot Expr Purif* 61:117-121
- Kim YS, Kwon TH, Yang MS (2004) Direct transfer and expression of human GM-CSF in tobacco suspension cell using *Agrobacterium*-mediated transfer system. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 78:133-138

8. BIBLIOGRAFIA

- Knäblein J (2005) Plant-based Expression of Biopharmaceuticals. In: Meyers RA (ed) Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, 2nd Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
- Ko K, Steplewski Z, Glogowska M, Koprowski H (2005) Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb. Proc Nat Acad Sci USA 102(19):7026-7030
- Koprivova A, Stemmer C, Altmann F, Hoffmann A, Kopriva S, Gorr G, Reski R, Decker EL (2004) Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans. Plant Biotechnol J 2:517–523
- Kowalski SP, Ehora RV, Kryder RD, Potter RH (2002) Transgenic crops, biotechnology and ownership rights: what scientists need to know. Plant J 31(4):407-421
- Kusnadi AR, Nikolov ZL, Howard JA (1997) Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. Biotechnol Bioeng 56:473-482
- Kwon TH, Seo JE, Kim J, Lee JH, Jang YS, Yang MS (2003) Expression and secretion of the heterodimeric protein interleukin-12 in plant cell suspension culture. Biotechnol Bioeng 81:870–875
- Lacroix MC, Guibourdenche J, Frenco JL, Muller F, Evain-Brion D (2002) Human placental growth hormone-A Review. Placenta 23(A) 16:S87–S94
- Lan PC, Tseng CF, Lin MC, Chang CA (2006) Expression and purification of human placental lactogen in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif 46:285-293
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal Variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor Appl Genet 60:197-214
- Le VQ, Belles-Isles J, Dusabenyagasani M, Tremblay FM (2001) An improved procedure for production of white spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. J Exp Bot 52(364):2089-2095
- Lee JH, Kim NS, Kwon TH, Jang YS, Yang MS (2002) Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. J Biotechnol 96:205-211
- Lee SY, Cho JM, Kim DI (2003) Effect of bacitracin on hGM-CSF production in suspension cultures of transgenic *Nicotiana tabacum* cells. Enzyme Microb Technol 33:353-357
- Lee SY, Kim DI (2002) Stimulation of murine granulocyte macrophage-colony stimulating factor production by Pluronic F-68 and polyethylene glycol in transgenic *Nicotiana tabacum* cell culture. Biotechnol Lett 24:1779-1783
- Lee SY, Kim YH, Roh YS, Myoung HJ, Lee KY, Kim DI (2004) Bioreactor operation for transgenic *Nicotiana tabacum* cell cultures and continuous production of recombinant

8. BIBLIOGRAFIA

- human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by perfusion culture. *Enzyme Microb Technol* 35:663-671.
- Lessard PA, Kulaveerasingam H, York GM, Strong A, Sinskey AJ (2002) Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metab Eng* 4:67-79
- Li D, O'Leary J, Huang Y, Huner NPA, Jevnikar AM, Ma S (2006) Expression of cholera toxin B subunit and the B chain of human insulin as a fusion protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep* 25(5):417-424
- Lin JJ (1995) Electrotransformation of *Agrobacterium*. In: Nickoloff J (Ed) Electroporation protocols for microorganisms. Humana Press, pp 171-180
- Liu F, Lee JM (1991) Effect of culture conditions on monoclonal antibody production from genetically modified tobacco suspension cultures. *Biotechnol Bioprocess Eng* 4:259-263
- Liu HL, Li WS, Lei T, Zheng J, Zhang Z, Yan XF, Wang ZZ, Wang YL, Si LS (2005) Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in transgenic tobacco plants. *Acta Biochim Biophys Sin* 37(3):153-158
- Liu S, Bugos RC, Dharmasiri N, Su WW (2001) Green fluorescent protein as a secretory reporter and a tool for process optimization in transgenic plant cell cultures. *J Biotechnol* 87:1-16
- López-Talavera JC, García-Ocaña A, Sipula I, Takane KK, Cozar-Castellano I, Stewart AF (2004) Hepatocyte growth factor gene therapy for pancreatic islets in diabetes: reducing the minimal islet transplant mass required in a glucocorticoid-free rat model of allogeneic portal vein islet transplantation. *Endocrinology* 145(2):467-474
- Ma JCK, Barros E, Bock R, Christou P, Dale PJ, Dix PJ, Fischer R, Irwin J, Mahoney R, Pezzotti M, Schillberg S, Sparrow P, Stoger E, Twyman RM (2005a) Molecular farming for new drugs and vaccines. *EMBO rep* 6(7):593-599
- Ma JKC, Chikwamba R, Sparrow P, Fischer R, Mahoney R, Twyman RM (2005b) Plant-derived pharmaceuticals—the road forward. *Trends Plant Sci* 10(12):580-585
- Ma JKC, Drake PMW, Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 4:794-805
- Macleon J, Koekemoer M, Olivier AJ, Stewart D, Hitzeroth II, Rademacher T, Fischer R, Williamson AL, Rybicki EP (2007) Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *J General Virol* 88:1460-1469

8. BIBLIOGRAFIA

- Magnuson NS, Linzmaier PM, Gao JW, Reeves R, An G, Lee JM (1996) Enhanced recovery of a secreted mammalian protein from suspension culture of genetically modified tobacco cells. *Protein Expr Purif* 7:220-228
- Manuell AL, Beligni MV, Elder JH, Siefker DT, Tran M, Weber A, McDonald TL, Mayfield SP (2007) Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnol J* 5(3):402-412
- Martin-Tanguy J, Martin C, Paynot M, Rossin N (1988) Effect of hormone treatment on growth bud formation and free amine and hydroxycinnamoyl putrescine levels in leaf explant of *Nicotiana tabacum* cultivated *in vitro*. *Plant Physiol* 88:600-604
- Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Nat Acad Sci USA* 89:11745-11749
- Matsumoto S, Ikura K, Ueda M, Sasaki R (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol Biol* 27: 1163-1172
- Mavituna AM (2005) Production of recombinant human serum albumin in transgenic plants and plant cells. Tesis doctoral
- Mayo KJ, Gonzales BJ, Mason HS (2006) Genetic transformation of tobacco NT-1 cells with *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Protoc* 1(3):1105-1111
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 3(3): reviews0004.1–reviews0004.10
- Mills DR, Lee JM (1996) A simple, accurate method for determining wet and dry weight concentrations of plant cell suspension cultures using microcentrifuge tubes. *Plant Cell Rep* 15:634-636
- Min SR, Woo JW, Jeong WJ, Han SK, Lee YB, Liu JR (2006) Production of human lactoferrin in transgenic cell suspension cultures of sweet potato. *Biol Plantarum* 50(1):131-134
- Mitra A, Zhang Z (1994) Expression of a human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s). *Plant Physiol* 106:977-981
- Mitsuhara I, Shirasawa-Seo N, Iwai T, Nakamura S, Honkura R, Ohashi Y (2002) Release from post-transcriptional gene silencing by cell proliferation in transgenic tobacco plants: possible mechanism for noninheritance of the silencing. *Genetics* 160:343-352
- Mitsuhara I, Ugaki M, Hirochika H, Ohshima M, Murakami T, Gotoh Y, Katayose Y, Nakamura S, Honkura R, Nishimiya S, Ueno K, Mochizuki A, Tanimoto H, Tsugawa H, Otsuki Y, Ohashi Y (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of

8. BIBLIOGRAFIA

- foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol* 37(1):49-59
- Mlynárová L, Keizer LCP, Stiekema WJ, Napa J-P (1996) Approaching the lower limits of transgene variability. *Plant Cell* 8:1589-1599
- Mlynárová L, Loonen A, Heldens J, Jansen RC, Keizer P, Stiekema WJ, Nap J-P (1994) Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region. *Plant Cell* 6:417-426
- Molina A, Hervás-Stubb S, Daniell H, Mingo-Castel AM, Veramendi J (2004) High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J* 2:141-153
- Mucciarelli M, Scannerini S, Gallino M, Maffei M (2000) Effects of 3,4-dihydroxybenzoic acid on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultured in vitro. Growth regulation in callus and organ cultures. *Plant Biosyst* 134(2):185-192
- Munro S, Pelham HRB (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48:899-907
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15:473-497
- Nachtigal MW, Nickel BE, Cattini PA (1993) Pituitary-specific repression of placental members of the human growth hormone gene family. *J Biol Chem* 268(12): 8473-8479
- Nagata T, Kumagai F (1999) Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. *Methods Cell Sci* 21:123-127
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S (1992) Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *Int Rev Cytol* 132:1-30
- Narang AS, Mahato RI (2006) Biological and biomaterial approaches for improved islet transplantation. *Pharmacol Rev* 58:194–243
- Nauerby B, Billing K, Wyndale R (1997) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci* 123:169-177
- Navarre C, Delannoy M, Lefebvre B, Nader J, Vanham D, Boutry M (2006) Expression and secretion of recombinant outer-surface protein A from the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, in *Nicotiana tabacum* suspension cells. *Transgenic Res* 15:325-335

8. BIBLIOGRAFIA

- Negrel J, Javelle F, Paynot M (1993) Biochemical basis of resistance of tobacco callus tissue cultures to hydroxyphenylethylamines. *Plant Physiol* 103:329-334
- Nemchinov LG, Paape MJ, Sohn EJ, Bannerman DD, Zarlenga DS, Hammond RW (2006) Bovine CD14 receptor produced in plants reduces severity of intramammary bacterial infection. *FASEB J* 20:1345-1351
- Niall HD, Hogan ML, Sauer R, Rosenblum IY, Greenwood FC (1971) Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc Nat Acad Sci USA* 68(4):866-869
- Nielsen JH, Galsgaard ED, Moldrup A, Friedrichsen BN, Billestrup N, Hansen JA, Lee YC, Carlsson C (2001) Regulation of β -cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes* 50(1):525-529
- Nowak W, Gawłowska M, Jarmolowski A, Augustyniak J (2001) Effect of nuclear matrix attachment regions on transgene expression in tobacco plants. *Acta Biochim Pol* 48(3):637-646
- Nykiforuk CL, Boothe JG, Murray EW, Keon RG, Goren HJ, Markley NA, Moloney MM (2006) Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnol J* 4(1):77-85
- Obregon P, Chargelegue D, Drake PMW, Prada A, Nuttall J, Frigerio L, Julian, Ma JKC (2006) HIV-1 p24-immunoglobulin fusion molecule: a new strategy for plant-based protein production. *Plant Biotechnol J* 4:195-207
- Odell TJ, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812
- Oh K, Cheon BY, Cho SH, Truong HQ, Ok SH, Jeung JU, Choi JW, Shin JS (2002) Expression of the bovine growth hormone alters the root morphology in transgenic tobacco plants. *Transgenic Res* 12:363-367
- Oyanguren I (2009) Producción de lactógeno placentario humano en suspensiones celulares transgénicas de tabaco: escalado del proceso y producción en biorreactores. Tesis Doctoral
- Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Río LA (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol Biochem* 40:521-530
- Panahi M, Alli Z, Cheng X, Belbaraka L, Belgoudi J, Sardana R, Phipps J, Altosaar I (2004) Recombinant protein expression plasmids optimized for industrial *E. coli* fermentation

8. BIBLIOGRAFIA

- and plant systems produce biologically active human insulin-like growth factor-1 in transgenic rice and tobacco cells. *Transgenic Res* 13:245-259
- Panahi M, Cheng X, Alli Z, Sardana R, Callaghan M, Phipps J, Altosaar I (2003) Plant-derived recombinant human insulin-like growth factor precursor prohormone IGF-1B caused differentiation of human neuroblastoma cell lines SH-SY5Y. *Mol Breed* 12:21-31
- Park DH, Yoon S-YH, Nam HG, Park JM (2002) Expression of functional human-cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase in transgenic tobacco. *Biotechnol Lett* 24:681-686
- Peterson RKD, Arntzen CJ (2004) On risk and plant-based biopharmaceuticals. *Trends Biotechnol* 22(2):64-66
- Pospíšilová J, Tichá I, Kadlecěk P, Haisel D, Plzáková S (1999) Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biol Plantarum* 42:481-497
- Pujol M, Gavilondo J, Ayala M, Rodríguez M, Gonzalez EM, Pérez L (2007) Fighting cancer with plant-expressed pharmaceuticals. *Trends Biotechnol* 25:455-459
- Ramírez N, Lorenzo D, Palenzuela D, Herrera L, Ayala M, Fuentes A, Pérez M, Gavilondo J, Oramas P (2000) Single-chain antibody fragments specific to the hepatitis B surface antigen, produced in recombinant tobacco cell cultures. *Biotechnol Lett* 22:1233-1236
- Ramírez N, Rodríguez M, Ayala M, Cremata J, Pérez M, Martínez A, Linares M, Hevia J, Páez R, Valdés R, Gavilondo JV, Selman-Housein G (2003) Expression and characterization of an anti-(hepatitis B surface antigen) glycosylated mouse antibody in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants and its use in the immunopurification of its target antigen. *Biotechnol Appl Biochem* 38:223-230
- Rao P, Roccisana J, Takane KK, Bottino R, Zhao A, Trucco M, García-Ocaña A (2005) Gene transfer of constitutively active Akt markedly improves human islet transplant outcomes in diabetic severe combined immunodeficient mice. *Diabetes* 54:1664-1675
- Reggi S, Marchetti S, Patti T, De Amicis F, Cariati R, Bembi B, Fogher C (2005) Recombinant humana cid β -glucosidase stored in tobacco seed is stable, active and taken up by human fibroblasts. *Plant Mol Biol* 57:101-113
- Reséndez-Perez D, Ramírez-Solís R, Varela-Echavarría A, Martínez-Rodríguez HG, Barrera-Saldaña HA (1990) Coding potential of transfected human placental lactogen genes. *Nucleic Acids Res* 18(16):4665-4670
- Ricordi C, Rastellini C (2000) Methods in pancreatic islet separation. In: Ricordi C (Ed) *Methods in Cell Transplantation*. Austin, TX, R.G. Landes, pp 433-438

8. BIBLIOGRAFIA

- Ritcher LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol* 18:1167-1171
- Ruggiero F, Exposito JY, Bournat P, Gruber V, Perret S, Comte J, Olganier B, Garrone R, Theisen M (2000) Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Lett* 469:132-136
- Ruiz Galán O, García Iglesias E, Gago Cabezas L, Gonzalez Rumayor V (2005) Plantas biofactoría, informe de vigilancia biotecnológica. Enríquez S (Ed) GENOMA ESPAÑA/ CIAA-PCM
- Sack M, Paetz A, Kunert R, Bomble M, Hesse F, Stiegler G, Fischer R, Katinger H, Stoeger E, Rademacher T (2007) Functional analysis of the broadly neutralizing human anti-HIV-1 antibody 2F5 produced in transgenic BY-2 suspension cultures. *FASEB J.* 21:1655-1664
- Saint-Jore-Dupas C, Faye L, Gomord V (2007) From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends Biotechnol* 25(7):317-323
- Sairam RV, Parani M, Franklin G, Lifeng Z, Smith B, MacDougall J, Wilber C, Sheikhi H, Kashikar N, Meeker K, Al-Abed D, Berry K, Vierling R, Goldman SL (2003) Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation. *Genome* 46:323-329
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis F (1989). In: Nolan C. (Ed) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger F, Nicklen S, Chase AR (1977) DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12):5463-5468
- Satoh J, Kato K, Shinmyo A (2004) The 5'-untranslated region of the tobacco *alcohol dehydrogenase* gene functions as an effective translational enhancer in plants. *J Biosci Bioeng* 98(1):1-8
- Schaller A (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220:183-197
- Schiermeyer A, Schinkel H, Apel S, Fischer R, Schillber S (2005) Production of *Desmodus rotundus* salivary plasminogen activator $\alpha 1$ (DSPA $\alpha 1$) in tobacco is hampered by proteolysis. *Biotechnol Bioeng* 89(7):848-858
- Schillberg S, Emans N, Fischer R (2002) Antibody molecular farming in plants and plant cells. *Phytochemistry Rev* 1:45-54
- Schillberg S, Twyman RM (2007) Pharma-Planta: recombinant pharmaceuticals from plants for human health. In: Engelhard M, Hagen K, Thiele F (Eds) *Pharming, a new branch of biotechnology*. Europäische Akademie, Germany, pp 13-31

8. BIBLIOGRAFIA

- Schillberg S, Twyman RM, Fischer R (2005) Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants-technology assessment. *Vaccine* 23:1764–1769
- Schinkel H, Schiermeyer A, Soeur R, Fischer R, Schillberg S (2005) Production of an active recombinant thrombomodulin derivative in transgenic tobacco plants and suspension cells. *Transgenic Res* 14:251-259
- Schouten A, Roosien J, van Engelen FA, de Jong GAM, Borst-Vrensens AWM, Zilverentant JF, Bosch D, Stiekema WJ, Gommers FJ, Schots A, Bakker J (1996) The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco *Plant Mol Biol* 30:781-793
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity (2000) Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity: text and annexes. Montreal: Secretariat of the Convention on Biological Diversity
- Selby MJ, Barta A, Baxter JD, Bell GI, Eberhardt NL (1984) Analysis of the major human chorionic somatomammotropin gene. Evidence for two functional promoter elements. *J Biol Chem* 259(21):13131-13138
- Selvanayagam CS, Tsai SY, Tsai M-J, Selvanayagam P, Saunders GF (1984) Multiple origins of transcription for the human placental lactógeno genes. *J Biol Chem* 259(23):14642-14646
- Shapiro J, Lakey JRT, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 434(4):230-238
- Sharma N, Kim TG, Yang MY (2006) Production and secretion of human interleukin-18 in transgenic tobacco cell suspension cultures. *Biotechnol Bioprocess Eng* 11:154-159
- Sharp JM, Doran PM (2001) Characterization of monoclonal antibody fragments produced by plant cells. *Biotechnol Bioeng* 73:338–346
- Shekhawat UKS, Ganapathi TR, Sunil Kumar GB, Srinivas L (2007) Sucrose-inducible expression of hepatitis B surface antigen using potato granule-bound starch synthase promoter. *Plant Biotechnol Rep* 1(4):199-206
- Shin J, Dunbrack RL, Lee S, Strominger JL (1991) Signals for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum studied with CD4 truncation mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1918-1922

8. BIBLIOGRAFIA

- Sivakumar G (2006) Bioreactor technology: a novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots. *Biotechnol J* 1:1419-1427
- Sojikul P, Buehner N, Mason HS (2003) A plant peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 100(5):2209-2214
- Sorenson RL, Brelje TC (1997) Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: β -cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 29(6):301-307
- Sorrentino A, Schillberg S, Fischer R, Rao R, Porta R, Mariniello L (2005) Recombinant human tissue transglutaminase produced into tobacco suspension cell cultures is active and recognizes autoantibodies in the serum of coeliac patients. *Int J Biochem Cell Biol* 37:842-851
- Sparrow PAC, Irwin JA, Dale PJ, Twyman RM, Ma JKC (2007) Pharma-Planta: road testing the developing regulatory guidelines for plant-made pharmaceuticals. *Transgenic Res* 16(2):147-161
- Spök A (2007) Molecular farming on the rise-GMO regulators still walking a tightrope. *Trends Biotechnol* 25(2):74-82
- Spök A, Twyman RM, Fischer R, Ma JKC, Sparrow PAC (2008) Evolution of a regulatory framework for pharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Trends Biotechnol* 26:506-517
- Stevens LH, Stoopen GM, Elbers IJW, Molthoff JW, Bakker HAC, Lommen A, Bosch D, Jordi W (2000) Effect of climate conditions and plant developmental stage on the stability of antibodies expressed in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 124:173-182
- Stout LE, Svensson AM, Sorenson RL (1997) Prolactin regulation of islet-derived INS-1 cells: characteristics and immunocytochemical analysis of STAT5 translocation. *Endocrinology* 138:1592-1603
- Strasser R, Stadlmann J, Schähs M, Stiegler G, Quendler H, Mach L, Glössl J, Weterings K, Pabst M, Steinkellner H (2008) Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like *N*-glycan structure. *Plant Biotechnol J* 6:392-402
- Streatfield SJ (2007) Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnol J* 5:2-15

8. BIBLIOGRAFIA

- Su WW (2006) Bioreactor engineering for recombinant protein production using plant cell suspension culture. In: Gupta SD, Ibaraki Y (Eds) *Plant Tissue Culture Engineering*. Springer, Netherlands, pp 135–159
- Tanurdzic M, Vaughn MW, Jiang H, Lee T-J, R. Slotkin RK, Sosinski B, Thompson WF, Doerge RW, Martienssen RA (2008) Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. *PLoS Biol* 6(12):2880-2895
- Taticek RA, Moo-Young M, Legge RL (1991) The scale-up of plant cell culture: engineering considerations. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 24:139-158
- Tekoah Y, Ko K, Koprowski H, Harvey DJ, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM (2004) Controlled glycosylation of therapeutic antibodies in plants. *Arch Biochem Biophys* 426:266–278
- Teli NP, Timko MP (2004) Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 79:125–145
- Torres E, Vaquero C, Nicholson L, Sack M, Stöger E, Drossard J, Christou P, Fischer R, Perrin Y (1999) Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies. *Transgenic Res* 8:441-449
- Tremblay R, Wang D, Jevnikar AM, Ma S (2010) Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnol Adv* 28:214–221
- Tsoi BM-Y, Doran PM (2002) Effect of medium properties and additives on antibody stability and accumulation in suspended plant cell cultures. *Biotechnol Appl Biochem* 35:171–180
- Turhan H (2004) Callus induction and growth in transgenic potato genotypes. *Afr J Biotechnol* 3(8):375-378
- Turner R, Foster GD (1995) The potential exploitation of plant viral translational enhancers in biotechnology for increased gene expression. *Mol Biotechnol* 3:225-236.
- Twyman RM, Schillberg S, Fischer R (2005) Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opin Emerg Drugs* 10(1):1-34
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol* 21:570-578
- Ulker B, Allen GC, Thompson WF, Spiker S, Weissinger AK (1999) A tobacco matrix attachment region reduces the loss of transgene expression in the progeny of transgenic tobacco plants. *Plant J* 18:253-263

8. BIBLIOGRAFIA

- Vain P, Worland B, Kohli A, Snape JW, Christou P, Allen GC, Thompson WF (1999) Matrix attachment regions increase transgene expression levels and stability in transgenic rice plants and their progeny. *Plant J* 18:233-242
- Vasavada RC, García-Ocaña A, Zawalich WS, Sorenson RL, Dann P, Syed M, Ogren L, Talamantes F, Stewart AF (2000) Targeted expression of placental lactogen in the beta cells of transgenic mice results in beta cell proliferation, islet mass augmentation, and hypoglycemia. *J Biol Chem* 275:15399-15406
- Vasavada RC, Gonzalez-Pertusa JA, Fujinaka Y, Fiaschi-Taesch N, Cozar-Castellano I, García-Ocaña A (2006) Growth factors and beta cell replication. *International J Biochem Cell Biol* 38:931-950
- Verwoerd TC, van Paridon PA, van Ooyen AJJ, van Lent JWM, Hoekema A, Pen J (1995) Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves. *Plant Physiol* 109:1199-1205
- Vitale A, Pedrazzini E (2005) Recombinant pharmaceuticals from plants: the endomembrane system as bioreactor. *Mol Interv* 5:216-225
- Voss A, Niersbach M, Hain R, Hirsch HJ, Liao YC, Kreuzaler F, Fischer R (1995) Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full-size antibody. *Mol Breed* 1:39-50
- Walker TL, Purton S, Becker DK, Collet C (2005) Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep* 24:629-641
- Walker WH, Fitzpatrick SL, Barrera-Saldaña HA, Reséndez-Pérez D, Saunders GF (1991) The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocrine Rev* 12:316-328
- Walsh G (2005) Current status of biopharmaceuticals: approved products and trends in approvals. In: Knäblein J (Ed) *Modern Biopharmaceuticals*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Wang DJ, Brandsma M, Yin Z, Wang A, Jevnikar AM, Ma S (2008) A novel platform for biologically active recombinant human interleukin-13 production. *Plant Biotechnol J* 6: 504-515
- Weathers PJ, Towler MJ, Xu J (2010) Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1339-1351
- Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD (2006) A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proc Nat Acad Sci USA* 103(18):7082-7087

8. BIBLIOGRAFIA

- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004) Global Prevalence of Diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053
- Witham FH (1968) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the cytokinin requirement of soybean cotyledon and tobacco stem pith callus tissues. *Plant Physiol* 43:1455-1457
- Woestenenk EA, Hammarström M, van den Berg S, Härd T, Berglund H (2004) His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. *J Struct Funct Genomics* 5:217-229
- World Health Organization (1999) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Geneva, Switzerland.
- Xu J, Okada S, Tan L, Goodrum KJ, Kopchick JJ, Kieliszewski MJ (2010) Human growth hormone expressed in tobacco cells as an arabinogalactan-protein fusion glycoprotein has a prolonged serum life. *Transgenic Res* 19(5):849-867
- Yano A, Maeda F, Takekoshi M (2004) Transgenic tobacco cells producing the human monoclonal antibody to hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol* 73:208-215
- Yano A, Takokoshi M, Morita E, Imai S, Nisizawa T, Hanada N (2006) Production of Fab fragment corresponding to surface protein antigen to *Streptococcus mutans* serotype c-derived peptide by *Escherichia coli* and cultured tobacco cells. *J Biosci Bioeng* 101(3):251-256
- Yepes LM, Aldwinckle HS (1994) Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 37:257-269
- Yoshida K, Shinmyo A (2000) Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor. *J Biosci Bioeng* 90(4):353-362
- Zheng G, Yang Y, Rao Q, Lin Y, Zhang B, Wu K (2006) Expression of bioactive human M-CSF soluble receptor in transgenic tobacco plants. *Protein Expr Purif* 46:367-373
- Zhou J-Y, Wu J-X, Cheng L-Q, Zheng X-J, Gong H, Shang S-B, Zhou E-M (2003) Expression of immunogenic S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus in transgenic potatoes. *J Virol* 77(16):9090-9093
- Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJJ, Farrand SK, Winans SC (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol* 182(14):3885-3895
- Zimmermann S, Schillberg S, Liao Y-C, Fisher R (1998) Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improve virus resistance in *Nicotiana tabacum*. *Mol Breed* 4:369-379