**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

# "Producción de la hormona del crecimiento humano por cultivos de raíces de *Brassica oleracea* var. *italica* (Brócoli) transformadas con el cDNA del gen *GH1*"

Tesis que presenta

**M. en C. Edgar García López**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de la tesis

**Dr. Graciano Calva Calva**

**México, D.F.** **Octubre 2013**

# Contenido

Contenido ..... i
Índice de Figuras ..... iii
Índice de Tablas ..... iv
Resumen ..... 1
Abstract ..... 2
1. Introducción ..... 3
2. Antecedentes ..... 6
2.1. Necesidades y Estrategias ..... 6
2.2. Agricultura Molecular ..... 8
2.3. Raíces transformadas como modelo de expresión heteróloga ..... 10
2.4. Proteína modelo: Hormona del crecimiento humano (hGH1) ..... 12
2.5. El gen de la hGH1 ..... 14
2.6. Actividad biológica y aplicaciones de la hGH1 ..... 15
2.7. Producción y mercado de la hGH1 ..... 16
2.8. Una alternativa de producción de hGH: La biotecnología vegetal ..... 17
2.9. Trabajo previo: El sistema de raíces transformadas de brócoli ..... 18
3. Planteamiento del problema ..... 21
4. Hipótesis ..... 23
5. Objetivos ..... 24
5.1. General ..... 24
5.2. Específicos ..... 24
6. Estrategia experimental ..... 25
7. Materiales y métodos ..... 28
7.1. Plásmidos ..... 28
7.2. Tinción histoquímica de β-glucuronidasa ..... 30
7.3. Cultivo de raíces en matraz ..... 30
7.4. Cultivo en biorreactores *airlift* ..... 31
7.5. Determinación de peso fresco y peso seco ..... 31
7.6. Determinación de azúcares totales y reductores ..... 32
7.7. Extracción de proteína total soluble (PTS) ..... 32
7.8. Determinación de actividad proteolítica ..... 32
7.9. Extracción de DNA genómico a partir de raíces transformadas ..... 33

7.10. Fraccionamiento de la PTS ..... 33
7.11. Determinación de la hGH1 por ELISA ..... 34
7.12. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) ..... 34
7.13. Detección de hGH1 por western blot ..... 35
7.14. Purificación de la hGH1 ..... 36
7.15. Tinciones de proteínas en geles de poliacrilamida ..... 36
7.16. Digestión Tríptica y extracción de péptidos ..... 37
7.17. Análisis MS MALDI-TOF para la identificación y caracterización de la proteína hGH1 transgénica ..... 39
7.18. Análisis estadístico ..... 39
8. Resultados ..... 40
8.1. Establecimiento de cultivos de raíces transformadas ..... 40
8.1.1. Confirmación de líneas transformadas con pCAMhGHE ..... 40
8.1.2. Contenido de proteína total soluble en cultivos de raíces ..... 41
8.1.3. Contenido de la hGH1 en raíces transformadas ..... 43
8.1.4. Selección de una línea élite en base a su producción de la hGH1 ..... 45
8.1.5. Actividad de proteasas en medio de cultivo ..... 46
8.1.6. Perfil de proteínas en extractos de PTS de raíces transformadas ..... 48
8.2. Purificación de la hGH1 ..... 49
8.2.1. Fraccionamiento de extractos de PTS ..... 49
8.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico ..... 52
8.2.3. Cromatografía de exclusión molecular ..... 55
8.3. Modificación de las condiciones de cultivo en matraz y biorreactor ..... 57
8.3.1. Efecto de la concentración y tipo de fuente de carbono y nitrógeno en la acumulación de biomasa y proteína ..... 57
8.3.2. Efecto de modificaciones estructurales de un biorreactor *airlift* sobre la acumulación de biomasa y proteína total soluble ..... 63
8.4. Caracterización de la proteína hGH1 heteróloga ..... 67
8.4.1. Análisis de western blot ..... 67
8.4.2. Análisis estructural por huella peptídica de la hGH1 por espectrometría de masas MALDI-TOF ..... 69
9. Discusión ..... 73
10. Conclusiones ..... 78
11. Aportes ..... 78
12. Perspectivas y recomendaciones ..... 79

13. Referencias ..... 80
14. Anexos ..... 88

## Índice de Figuras

Figura 1. Características de los principales métodos de producción de proteínas heterólogas ..... 7
Figura 2. Modelo del mecanismo de acción de la hGH1.. ..... 14
Figura 3. Expresión de GUS en raíces transformadas y no transformadas ..... 19
Figura 4. Estrategia experimental ..... 25
Figura 5. Mapa de los vectores A) pCAMBIA1105.1 y B) pCAMhGHE. ..... 29
Figura 6. Líneas transformadas con el vector pCAMhGHE. ..... 41
Figura 7. Crecimiento y proteína total soluble de los cultivos de raíces. ..... 42
Figura 8. Crecimiento y producción de la hGH1 en cultivos de raíces ..... 44
Figura 9. Actividad de proteasas de raíces transformadas y no transformadas ..... 47
Figura 10. Perfil de proteínas en los extractos de las raíces transformadas ..... 49
Figura 11. Perfil de las fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio. 50
Figura 12. Fracciones de 3-50 kDa (-50 kDa) y menores a 3 kDa (-3kDa) ..... 52
Figura 13. Separación por cromatografía de intercambio iónico FPLC. ..... 53
Figura 14. Cromatograma completo del gradiente para el análisis de intercambio iónico ..... 54
Figura 15. Análisis por cromatografía de exclusión molecular ..... 56
Figura 16. Gráfica de contorno de acumulación de biomasa en los cultivos de raíces transformadas. ..... 59
Figura 17. Superficies de respuesta de acumulación de PTS (mg/L). ..... 60
Figura 18. Cultivos de raíces transformadas en el biorreactor *airlift* ..... 65
Figura 19. Análisis de western blot contra la hGH1 ..... 68
Figura 20. Geles teñidos con nitrato de plata y azul de Coomassie ..... 70
Figura 21. Espectros de masas de la digestión tríptica de hGH1 estándar hGH1 expresada heterólogamente ..... 71

# Índice de Tablas

Tabla 1. Ejemplos de proteínas heterólogas expresadas en sistemas vegetales ..... 9
Tabla 2. Formulación de los geles usados en SDS-PAGE..... 35
Tabla 3. Productividad de la hGH1 de las líneas transformadas con el T-DNA de la construcción pCAMhGHE ..... 46
Tabla 4. Tratamientos para evaluar el efecto de la concentración de las fuentes de nitrógeno y carbono en la acumulación de proteína y biomasa de raíces transformadas ..... 58
Tabla 5. Análisis de varianza para evaluar el efecto de la sacarosa y nitrógeno sobre la producción de biomasa (gPF/L) y proteína total soluble por cultivos de raíces transformadas de brócoli. ..... 61
Tabla 6. Contenido específico de la hGH1 en tratamientos seleccionados del experimento de modificación de medio de cultivo. Tratamiento control (TC) raíces creciendo en medio de cultivo SH sin modificar. ..... 63
Tabla 7. Efecto de la modificación estructural del reactor sobre la acumulación de biomasa, proteína total soluble y contenido de la hGH1. ..... 66
Tabla 8. Resumen de los péptidos identificados por el análisis de huella peptídica para identificación y caracterización de la hGH1 heteróloga. ..... 72

## DECLARATORIA

**“Producción de la hormona del crecimiento humano por cultivos de raíces de *Brassica oleracea* var. *italica* (Brócoli) transformadas con el cDNA del gen *GH1*”**

Certifico que el contenido de esta tesis es el resultado de mi trabajo, excepto donde se dan las debidas referencias a otros autores, como parte complementaria de una sección del trabajo experimental. Esta tesis, no ha sido presentada previamente en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de Instituto Politécnico Nacional, ni en alguna otra institución de enseñanza.

**M. en C. Edgar García López**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Ingeniería Metabólica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del profesor investigador Dr. Graciano Calva Calva, y la asesoría de los profesores investigadores: Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez, Dra. María del Carmen Montes Horcasitas, Dr. Fernando José Esparza García y Dr. Armando Ariza Castolo.

**Agradezco al:**

CINVESTAV-IPN Unidad Zacatenco en su Departamento de Biotecnología y Bioingeniería y a la totalidad del personal del Laboratorio de Ingeniería Metabólica por el apoyo prestado en todo momento y en todo aspecto para el desarrollo de este trabajo. También agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada al autor de esta tesis.

**Agradezco sinceramente:**

Al Dr. Graciano Calva Calva por la increíble cantidad de tiempo que invirtió en la supervisión de mi trabajo experimental y en la redacción de mis escritos. Gracias por mostrar, a su manera, como debe iniciarse un investigador.

A la Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez por sus atinadas intervenciones en el proyecto y por poner atención a aspectos de mi crecimiento más allá de lo académico.

A la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez por su disposición a mejorar mi investigación y la confianza en nuestros objetivos.

Al Dr. Armando Ariza Castolo por los aportes oportunos en el análisis estructural de la proteína.

Al Dr. Fernando José Esparza García por compartir su experiencia y permitirme aplicarla a mi trabajo.

Al QBP. Octavio Gómez Guzmán por todo el apoyo en el trabajo experimental, ideas para hacer funcionar las técnicas y por la agradable convivencia.

**Agradezco emotivamente:**

A mi Madre porque sin su apoyo y confianza no habría podido realizar mis sueños y proyectos.

A mí Abuela, mi Padre, mis Hermanas y Mónica porque mucho de mi ímpetu en momentos difíciles lo saque de tenerlos, a mi lado o en mi memoria.

A mis amigos, que no son pocos, por su apoyo, por compartir momentos y ayudarme en momentos cuando lo necesité y no cobrarme sus asesorías profesionales. Compartan conmigo el logro.

**Producción de la hormona del crecimiento humano por cultivos de raíces de *Brassica oleracea* var. *italica* (Brócoli) transformadas con el cDNA del gen *GH1***

# Resumen

La necesidad creciente de compuestos biológicamente activos, como proteínas y enzimas de interés farmacéutico e industrial, no son cubiertas completamente por las tecnologías convencionales de producción. Debido a esto se han buscado alternativas para su producción; entre estas ha surgido la Agricultura Molecular, que es la utilización de plantas o el cultivo *in vitro* de sus células, tejidos u órganos como una estrategia viable para obtener compuestos heterólogos bioactivos, como la proteína hormona de crecimiento humano (hGH1). Esta proteína, modelo del presente trabajo, se prescribe para el tratamiento de afecciones relacionadas a la baja estatura y senectud.

En este proyecto se investigó la capacidad biosintética de raíces transformadas de Brócoli en la expresión de la hGH1, a nivel transcripcional y traduccional, con el objetivo de establecer las bases para un bioproceso que coadyuve a la satisfacción de la demanda de proteínas terapéuticas. Se seleccionaron 12 líneas de raíces productoras de la hGH1. Se seleccionó la línea BRGHE18 como línea élite por su mejor productividad para los demás experimentos. Utilizando esta línea, se estudió el efecto de las condiciones básicas de cultivo, a nivel de matraz y biorreactor de laboratorio, llegando a incrementar hasta 3.5 y 2.5 veces el crecimiento del cultivo cuando se modificaron las fuentes de nitrógeno y carbono en matraz y en biorreactor, respectivamente. La producción de la hGH1 fue de 5.1±0.42 µg/g PS en matraces y 7.8±0.3 µg/g PS en biorreactor, con una productividad de 0.68±0.05 y 1.5±0.06 µg/g PS*d, respectivamente. Partiendo de extractos proteicos y sus fracciones, de estos cultivos, se obtuvo la proteína hGH1 purificada por filtración tangencial, cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel. En esta muestra (c.a. 90% de pureza) fue investigada la identidad de la proteína por análisis de ELISA, western blot y huella peptídica mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. El análisis por MALDI-TOF mostró que la hGH1 heteróloga tiene una secuencia aminoacídica parcial idéntica a la reportada y que los puentes disulfuro están localizados en las mismas posiciones que la proteína nativa. Este trabajo establece las bases del estudio de los cultivos de raíces de *Brassica oleracea* var. *italica*, como sistema de expresión heteróloga de proteínas con actividad biológica.

**Human Growth Hormone production by *Brassica oleracea* var. *italica* (Broccoli) hairy root cultures transformed with the hGH1 cDNA from *GH1* gene**

# Abstract

The increasing demand for biologically active compounds, such as proteins and enzymes with industrial application, are not completely covered by the current production technologies. In this scenario, alternatives for the production of these compounds have been investigated. One of these strategies is “Molecular Farming”, defined as the utilization of whole plants or the *in vitro* culture of their cells, tissue and organs as a viable alternative for the production of this kind of compounds, for instance the human growth hormone (hGH1). This protein, model in the present work, is prescribed for the treatment of diseases related with short height and senescence.

The aim of this project was to investigate the biosynthetic capability of the Broccoli Hairy Roots system for the expression of the hGH1 to establish the basis for a bioprocess that contributes to the satisfaction of the demand of therapeutic proteins. Twelve hairy roots lines producers of hGH1 were selected in this study. Additionally, the line BRGHE18 was selected as elite for its better productivity for the protein characterization experiments. With this line, also the effect of the medium culture composition and process parameters at both flasks and laboratory bioreactor level were investigated. The hairy roots growth was 3.5x and 2.5x higher when the nitrogen and carbon sources were modified in flask and bioreactor, respectively. The production of hGH1 was 5.1±0.42 µg/g DW in flasks and 7.8±0.3 µg/g DW in bioreactor, with productivity of 0.68±0.05 and 1.5±0.06 µg/gDW*d respectively. The hGH1 produced by these cultures was purified by tangential filtration, anionic exchange chromatography, and gel filtration. The identity of this purified protein (c.a 90% purity) was investigated by ELISA, western blot, and peptidic finger print MALDI-TOF MS analysis. The MALDI-TOF analysis further revealed that the heterologous hGH1 protein might have an aminoacidic sequence and disulfide bonds identical to that reported for the native somatotropin or hGH1 protein. Therefore, this study successfully establishes the basis for hairy root cultures of *Brassica oleracea* var. *italic* to be a proper heterologous expression system for biologically active proteins production.

# 1. Introducción

Con el desarrollo y el potencial generado por el Proyecto Genoma Humano y los respectivos avances en biotecnología y biología molecular surgió una revolución en el desarrollo de nuevas estrategias para la obtención de biofármacos o moléculas biológicamente activas. Una de las estrategias más especializadas derivadas de estos avances es la obtención de proteínas heterólogas con actividad terapéutica y aplicación biotecnológica (Cramer *et al*. 1999).

Estas proteínas en su mayoría se producen por tecnologías de cultivo de células animales (60%) y bacterianas (30%). Sin embargo, se prevé que para el año 2025 esas tecnologías serán insuficientes para cubrir la demanda del mercado (Calva-Calva y Pérez-Vargas 2005). En este contexto los cultivos *in vitro* de células, tejidos, órganos vegetales y plantas transgénicas son una alternativa real, económicamente viable, factible y segura para coadyuvar a esa posible deficiencia. Se ha demostrado que plantas transgénicas, además de su uso como alimentos, pueden producir proteínas de origen viral que se ensamblan formando partículas similares a virus (VLPs) con la finalidad de ser usadas coma vacunas comestibles, por ejemplo el antígeno de superficie de la hepatitis B y del virus "Norwalk" (Mason *et al*. 1996). Aunque los temores sobre su consumo y las regulaciones sanitarias, hacen rehusar la utilización de plantas como alimentos transgénicos y no permiten su liberación al ambiente (Calva-Calva y Pérez-Vargas 2005), éstas tienen cualidades importantes que las hacen un sistema biológico interesante para la producción de proteínas con fines farmacéuticos. Entre ellas, a) bajos costos de producción, b) tiempo reducido para llegar al mercado, c) oferta potencialmente ilimitada, d) procesamiento de proteínas eucariotas y, e) bioseguridad del producto

(Fischer *et al*. 2004). En consecuencia, las plantas pueden ser sistemas alternativos para la producción eficiente de proteínas humanas que requieren de modificaciones postraduccionales que los microorganismos no pueden realizar. Dentro de estas proteínas se encuentra las reguladoras de crecimiento e inhibidoras del ciclo celular; que en sistemas animales de producción impactarían negativamente tanto a los animales transgénicos como a los cultivos de células *in vitro* en los que se expresen. Por otro lado, las plantas y sus tejidos no son huéspedes de patógenos humanos (Miele 1997), por lo que pueden usarse como vacunas comestibles, es decir, que a través de su ingesta se pueda generar una respuesta inmune en el individuo debido a la presencia de la proteína heteróloga (Sala *et al*. 2003).

Con la meta de establecer procesos basados en biotecnología vegetal, nuestro grupo de trabajo ha establecido cultivos de células en suspensión y de raíces transformadas que expresan adecuadamente este tipo de proteínas, entre ellas la subunidad β de la enterotoxina termolábil de *E coli* (LTB) a partir de un gen sintético (Calva-Calva y Pérez-Vargas 2005) y la fenilalanina ammonio liasa a partir del gen de PAL de *Petroselinum crispum* (Perejil) expresado en raíces transformadas de *Capsicum chinense* (López-Sánchez et al., 2003; Calva-Calva et a., 2005). También se han establecido cultivos de raíces de *Brassica oleracea* var. *italica* (Brócoli) transformadas con diversos genes o su cDNA, incluyendo el de la hormona del crecimiento humano isoforma 1 (hGH1) ), la insulina y la proteína L1 del virus del papiloma humano (García-López et al., 2008; Calva-Calva et al., 2012). Estas raíces pueden cultivarse en biorreactores o usarse para regenerar plantas transgénicas. Ambos sistemas pueden usarse para estudiar la producción de proteínas terapéuticas. Utilizando esos cultivos de Brócoli, en este

proyecto se estudió la producción de la proteína hGH1 en cultivos a nivel de matraz y biorreactor. También se implementó un tren de purificación que permitió obtener proteína hGH1 con más del 90% de pureza. Las muestras purificadas se caracterizaron parcialmente mediante ELISA, western blot y huella peptídica vía espectrometría de masas MALDI-TOF.

# 2. Antecedentes

## 2.1. Necesidades y Estrategias

La creciente necesidad de moléculas con actividad terapéutica y para diagnóstico, como proteínas o péptidos de variada complejidad, ha fomentado el desarrollo de estrategias utilizando sistemas de expresión heteróloga para su producción (Fig. 1). Los sistemas que se han utilizado con este fin incluyen bacterias, levaduras, cultivos celulares de mamífero, insectos y de plantas, hasta animales y plantas transgénicas (Larrick y Thomas 2001). Dentro de estos, los bacterianos son los más utilizados debido a que pueden producir niveles relativamente altos de proteína heteróloga; sin embargo, frecuentemente casi la totalidad de esta proteína es llevada a cuerpos de inclusión insolubles y tienen limitadas o nulas capacidades de realizar modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, plegamiento a estructuras multiméricas y formación de puentes disulfuro (Daniell et al. 2001; Shadwick y Doran 2007). Por otro lado, los sistemas eucariotas son capaces de glicosilar proteínas de manera adecuada, con la excepción de las levaduras que pueden llegar a hiperglicosilar. También pueden realizar modificaciones postraduccionales como plegamiento y formación correcta de enlaces disulfuro; aunque dentro de estos últimos los sistemas animales requieren condiciones caras de cultivo y pueden ser llevados solo a escala de producción limitada (Twyman et al. 2003). Los sistemas vegetales, por otro lado, ya sean cultivos in vitro o como plantas transgénicas completas poseen, además de lo mencionado anteriormente para los sistemas eucariotas, capacidad para modificar postraduccionalmente las proteínas heterólogas de manera prácticamente idéntica a las células animales. Otras ventajas son su capacidad para ensamblar y plegar proteínas multiméricas adecuadamente (Fig.1). Además, se ha

corroborado que los sitios de glicosilación en proteínas de origen de mamífero producidas en sistemas vegetales son los mismos que en las proteínas nativas, por lo que potencialmente pueden presentar la misma actividad biológica que las glicoproteínas nativas (Bardor et al. 2009). Por lo anterior, los sistemas vegetales representan alternativas reales de producción de estas moléculas y se podrían utilizar para cumplir la demanda creciente de la población, aprovechando las opciones e instalaciones industriales actuales.

**Figura 1. Características relevantes de los principales métodos de producción de proteínas heterólogas.**

## 2.2. Agricultura Molecular

Los sistemas de expresión heteróloga basados en plantas, en las pasadas dos décadas se han transformado en sistemas alternativos convenientes, económicos y seguros comparados con los sistemas basados en el cultivo a gran escala de microorganismos o células animales, o la utilización de organismos transgénicos (Fischer *et al*. 2012). Estas estrategias biotecnológicas para la producción de compuestos y proteínas terapéuticas con actividad biológica y farmacéutica utilizando plantas, son conocidas como *Agricultura Molecular* (Molecular Farming). Su objetivo es utilizar el potencial de la agricultura y los cultivos *in vitro* de plantas para cultivar y cosechar plantas o sus células produciendo los compuestos de interés (Fischer *et al*. 2004). Desde su concepción, se han realizado numerosos estudios para cumplir este objetivo, y actualmente se expresa una amplia variedad de proteínas en diferentes sistemas vegetales, incluyendo la producción de anticuerpos, vacunas comestibles y biofármacos a base de proteínas virales, bacterianas, animales y humanas (Tabla 1). Por lo tanto, la agricultura molecular tiene el potencial de suplir virtualmente cantidades ilimitadas de proteínas con diversas propiedades biológicas, como anticuerpos, reguladores de crecimiento, para diagnóstico, enzimas y otras proteínas de interés industrial. Así, cabe destacar que, los sistemas vegetales son cada vez más aceptados para su utilización en la obtención de compuestos bioactivos, como los metabolitos secundarios con actividad anticancerígena que produce la empresa RooTec (rootec.com) utilizando sistemas de cultivo de órganos vegetales y últimamente como una plataforma general para la producción de proteínas heterólogas (Twyman *et al*. 2003).

**Tabla 1. Ejemplos de proteínas heterólogas expresadas en sistemas vegetales**

| Proteína | Planta(s) Referencia(s) | |
|---|---|---|
| **SIgA anti *Streptococcus mutans*** | Tabaco (Chong *et al*. 1997; Ma *et al*. 1995) | **Anticuerpos** |
| **IgG anti virus herpes** | Soya (Zeitlin *et al*. 1998) | |
| **Anti-Antígeno carcinoembrionario** | Arroz y trigo (Stoger *et al*. 2000) | |
| **Idiotipos de linfoma** | Tabaco (McCormick *et al*. 1999) | |
| **Antígeno de superficie de hepatitis B** | Tabaco (Smith *et al*. 2002) | |
| **Vacuna de la rabia** | Tabaco (Modelska *et al*. 1998) | **Vacunas** |
| **Proteínas de cápside del virus Norwalk** | Tabaco y papa (Mason *et al*. 1996) | |
| **Virus de la gastroenteritis porcina** | Tabaco (Tuboly *et al*. 2000) | |
| **Toxina LT-B de *E. coli.*** | Papa (Mason *et al*. 1996; Tacket *et al*. 1998) | |
| **Toxina del cólera CT-B** | Papa (Arakawa *et al*. 1997; Ma *et al*. 1997) | |
| **GAD67 de ratón** | Papa (Dalsgaard *et al*. 1997) | |
| **Colágeno** | Tabaco (Ruggiero *et al*. 2000) | **Otras proteínas** |
| **Lactoferrina** | Papa (Chong y Langridge 2000) | |
| **Hormona de crecimiento** | Tabaco (Staub *et al*. 2000) | |
| **Eritropoyetina** | Tabaco (Kusnadi *et al*. 1997) | |
| **Citocromo P450 2E1 conejo** | Belladona (Banerjee *et al*. 2002) | |
| **Antitripsina α1 humana** | Arroz (Trexler *et al*. 2002) | |
| **Interleucina 2 humana** | Tabaco (Magnuson *et al*. 1998) | |

Múltiples escenarios pueden ser planteados para la producción por agricultura molecular de proteínas heterólogas con grandes ventajas sobre la producción por los métodos convencionales, como es el caso de las plantas transgénicas con las que pueden obtenerse grandes cantidades del producto a menor costo (Fischer *et al*. 2012). Esto último, debido a que la agricultura es una tecnología relativamente barata y que los niveles de producción establecidos pueden ser alcanzados sembrando áreas grandes de tierra (Shadwick y Doran 2005). Más aún, los costos pueden ser abatidos sustancialmente si las proteínas heterólogas no requieren ser extraídos de la biomasa de la planta, como en el caso de las vacunas comestibles. No obstante esas ventajas, la utilización de plantas transgénicas podría no ser la mejor opción, o al menos, no la

primera, para la producción de proteínas heterólogas. En primer lugar por la variabilidad introducida al proceso de producción debido a diversos factores, como el clima cambiante y composición no uniforme del suelo. Cualquiera de estos factores podría resultar en niveles de producción y calidad impredecibles (Miele 1997). Aunado a esto, están las restricciones legislativas en diferentes países para siembra de plantas transgénicas a cielo abierto, como lo es el caso México en el cual la legislación en cuanto estos aspectos es aún incierta. Es en estos escenarios en los que se plantea la utilización de los cultivos vegetales *in vitro* en todas sus modalidades como una alternativa de producción, ya que además de ofrecer condiciones controladas de cultivo, que no solo aseguran una mayor estabilidad y calidad del producto, sino que no implican la liberación de organismos transgénicos al medio ambiente. Al utilizar cultivos de tejidos vegetales también se puede facilitar la recuperación y purificación de las proteínas heterólogas debido a la utilización de medios de cultivo de composición simple y conocida. Otra ventaja importante es que como la mayoría de los patógenos de plantas son incapaces de infectar a los humanos, los riesgos de infección por patógenos potencialmente presentes en el producto transgénico son reducidos. Debido a ello, en este trabajo se decidió explorar el potencial del sistema de raíces transformadas como un sistema de producción utilizando como modelo a la proteína hGH1 o somatotropina.

### 2.3. Raíces transformadas como modelo de expresión heteróloga

Las raíces transformadas o *Hairy Roots,* son estructuras neoplásicas producidas mediante la movilización de DNA foráneo de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* al genoma de las células de una planta (Tzfira y Citovsky 2006). Tienen crecimiento acelerado comparado con el exhibido por las raíces no transformadas, pueden ser

propagadas indefinidamente en medio líquido, son homogéneas genéticamente y mantienen su estabilidad morfológica aún en ausencia de reguladores exógenos de crecimiento vegetal (Twyman *et al*. 2003). Debido a ello, los cultivos vegetales *in vitro* con más auge para la producción de compuestos biológicamente activos, están los de raíces transformadas, aunque se han utilizado principalmente para estudiar el metabolismo secundario en plantas por su eficiencia para la producción de estos compuestos. Sin embargo, estos sistemas tienen gran potencial también para la producción de proteínas heterólogas al poder introducir secuencias de DNA foráneo de interés al genoma vegetal utilizando vectores binarios y/o desarmados (Hu y Du 2006).

Las características de los cultivos de raíces son interesantes para el establecimiento de bioprocesos de producción de compuestos biológicamente activos. Además, son de fácil manipulación y tienen capacidad para sintetizar compuestos de interés que no pueden ser producidos por células desorganizadas (Hu y Du 2006). También se ha encontrado que poseen buena estabilidad en la producción de proteínas foráneas por largos plazos (Sharp y Doran 2001).

Aunque muchas proteínas con actividad biológica son producidas utilizando numerosos sistemas heterólogos de expresión, como los cultivos bacterianos y de levaduras, células de mamífero y animales completos que pueden excretar las proteínas recombinantes en la leche; los sistemas vegetales ofrecen ventajas significativas. Por ser eucariotas, los cultivos vegetales pliegan y ensamblan correctamente proteínas complejas presentando capacidad para realizar modificaciones postraduccionales como glicosilaciones y formación de enlaces disulfuro en las posiciones adecuadas (Doran 2006a). Por otro lado, los cultivos de raíces transformadas tienen ventajas sobre las plantas transgénicas

completas para la producción de proteínas heterólogas debido al mayor control sobre el proceso de producción ya que se trata de un proceso hermético y se evita la posible diseminación del transgen al ambiente; tienen ciclos de producción más cortos y, bajo estrategias adecuadas, las proteínas pueden ser más fáciles y baratas de purificar al ser excretadas al medio de cultivo (Guillon *et al*. 2006; Hellwig *et al*. 2004; Twyman *et al*. 2003). Ejemplos de proteínas expresadas en raíces transformadas son anticuerpos funcionales y la fosfatasa alcalina humana (Gaume *et al*. 2003; Wongsamuth y Doran 1997). También se ha logrado la inserción y expresión de los genes necesarios para la biosíntesis de polímeros como el poli-hidroxibutirato (PHB) por raíces transformadas de betabel (Menzel *et al*. 2003) y proteínas complejas como el citocromo P450 E21 de conejo en raíces de belladona (Banerjee *et al*. 2002). No obstante, hasta el momento no se encontraron reportes sobre bioprocesos a nivel comercial para la producción de proteínas heterólogas mediante este sistema, aunque anteriormente se reportaron varios procesos a punto de ser comercializados (Fischer *et al*. 2012).

### 2.4. Proteína modelo: Hormona del crecimiento humano (hGH1)

La hormona de crecimiento humano en su isoforma 1 (hGH1) se seleccionó para este trabajo como proteína modelo. Forma parte de una familia de proteínas producidas en la glándula pituitaria anterior ubicada en la base del cerebro (Strobl y Thomas 1994). Dentro de las proteínas de esta familia, la más ampliamente distribuida, abundante y con los mayores efectos es la isoforma 1 también conocida como somatotropina. La hGH1 es una hormona que es sintetizada como pre-hormona que contiene un péptido señal de 26 aminoácidos para ser secretada (Strobl y Thomas 1994). El procesamiento postraduccional, el corte del péptido señal y la formación de los enlaces disulfuro, sucede

cuando la hormona es transferida a través del retículo endoplásmico rugoso hasta las vesículas de almacenamiento en las células somatótropas (Fig. 2A). La proteína procesada es una cadena sencilla de 191 aminoácidos, tiene un peso molecular aproximado de 22 kDa y un punto isoeléctrico (pI) 4.78. La conformación biológicamente activa de la hGH1 es estabilizada por dos puentes disulfuro (C52-C164 y C181-C188). Proporcionalmente, 54 % de la molécula son hélices (Fig. 2A). Es decir, 5 hélices que comprenden 104 residuos y el resto de cadenas lineales de aminoácidos. La estructura tridimensional de la hGH fue determinada por el método de difracción de rayos X en 1995 (Chantalat *et al*. 1995).

```
        10         20         30         40         50         60
MATGSRTSLL LAFGLLCLPW LQEGSAFPTI PLSRLFDNAM LRAHRLHQLA FDTYQEFEEA

        70         80         90        100        110        120
YIPKEQKYSF LQNPQTSLCF SESIPTPSNR EETQQKSNLE LLRISLLLIQ SWLEPVQFLR

       130        140        150        160        170        180
SVFANSLVYG ASDSNVYDLL KDLEEGIQTL MGRLEDGSPR TGQIFKQTYS KFDTNSHNDD

       190        200        210
ALLKNYGLLY CFRKDMDKVE TFLRIVQCRS VEGSCGF
```

**El péptido señal (26 aminoácidos) se muestra en negritas y los residuos entre los cuales se establecen los puentes disulfuro en negritas subrayadas.**

La proteína madura se une a receptores citocina tipo I constitutivamente homodimerizados, ubicados en la superficie de las células blanco (Fig. 2B). Este reconocimiento de la hGH1 por los receptores (GHR) causa el reposicionamiento de los dominios intracelulares (ICDs) resultando en la activación de las tirosín-cinasas (JAK2) asociadas al receptor y la transducción de señales (Brooks *et al*. 2008).

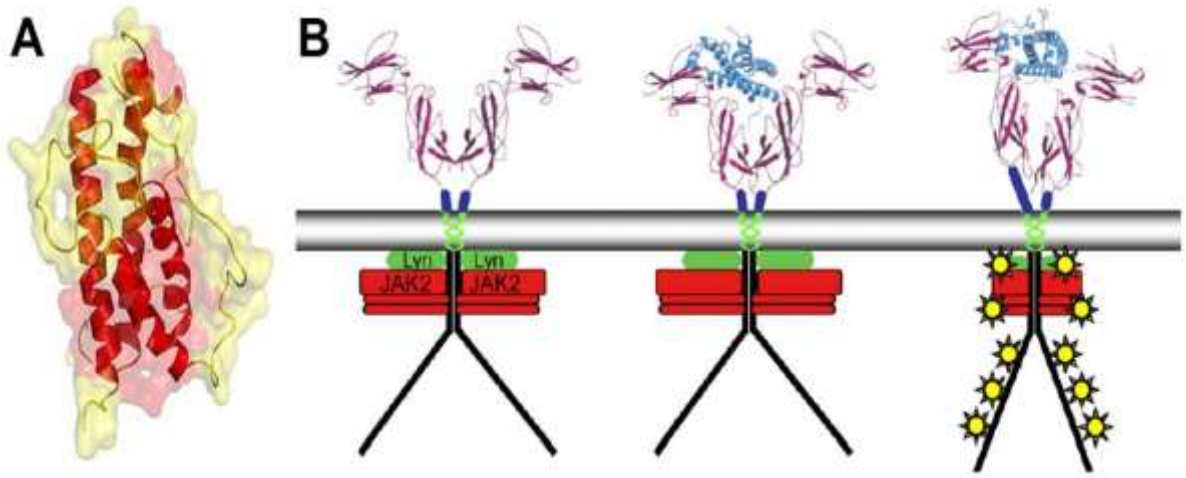


**Figura 2. Modelo del mecanismo de acción de la hGH1. A) Estructura tridimensional modelada de la hGH1. B) El reconocimiento de la hGH1 al dímero de receptor causa cambios estructurales que incluyen rotación de las subunidades receptoras, produciendo realineamiento de las cinasas JAK2 y Lyn para activarse mutuamente por transfosforilación, iniciando las cascadas de señalización (indicadas por las estrellas). Modificado de Brooks *et al*. 2008.**

### 2.5. El gen de la hGH1

El gen de la hGH1, junto con los otros 4 genes de las proteínas relacionadas, están localizados en el locus de la hormona de crecimiento humano en el cromosoma 17 ubicados en la misma orientación transcripcional. Los 5 genes comparten un alto grado de identidad en la secuencia (Barsh *et al*. 1983). El mecanismo de "splicing" (corte y empalme de RNA) alternativo produce isoformas, lo que ha llevado a una diversidad y a una posible especialización. El gen de la isoforma 1 contiene 5 exones, después de madurado el mRNA contiene solo la región codificante. Mediante retrotranscripción teniendo como templado este mRNA se genera el cDNA o DNA complementario, con la siguiente secuencia de 823 nucleótidos.

**Secuencia nucleotídica del cDNA de la hGH1**

```
  1 aggatcccaa ggcccaactc cccgaaccac tcagggtcct gtggacagct cacctagctg
 61 caatggctac aggctcccgg acgtccctgc tcctggcttt tggcctgctc tgcctgccct
121 ggcttcaaga gggcagtgcc ttcccaacca ttcccttatc caggcttttt gacaacgcta
181 tgctccgcgc ccatcgtctg caccagctgg cctttgacac ctaccaggag tttgaagaag
241 cctatatccc aaaggaacag aagtattcat tcctgcagaa cccccagacc tccctctgtt
301 tctcagagtc tattccgaca ccctccaaca gggaggaaac acaacagaaa tccaacctag
361 agctgctccg catctccctg ctgctcatcc agtcgtggct ggagcccgtg cagttcctca
421 ggagtgtctt cgccaacagc ctggtgtacg gcgcctctga cagcaacgtc tatgacctcc
481 taaaggacct agaggaaggc atccaaacgc tgatggggag gctggaagat ggcagccccc
541 ggactgggca gatcttcaag cagacctaca gcaagttcga cacaaactca cacaacgatg
601 acgcactact caagaactac gggctgctct actgcttcag gaaggacatg gacaaggtcg
661 agacattcct gcgcatcgtg cagtgccgct ctgtggaggg cagctgtggc ttctagctgc
721 ccgggtggca tccctgtgac ccctccccag tgcctctcct ggccctggaa gttgccactc
781 cagtgcccac cagccttgtc ctaataaaat taagttgcat ca <823
```

**La secuencia correspondiente al péptido señal se muestra subrayada y la región codificante de la hGH1, hasta el codón de terminación, en cursivas. Debe notarse que la proteína hGH1 madura no comienza con metionina debido a la remoción del péptido señal durante el procesamiento postraduccional.**

## 2.6. Actividad biológica y aplicaciones de la hGH1

La isoforma 1 de la hGH, ejerce sus efectos en casi todos los órganos del cuerpo, estimulando el crecimiento en todos los tejidos y favoreciendo el aumento del tamaño celular, estimula la mitosis favoreciendo la proliferación e induce la diferenciación específica de ciertos tipos celulares, como las células de crecimiento óseo y las células musculares, entre otros efectos directos e indirectos. Estas funciones han hecho que la hGH1 sea utilizada en el tratamiento de diversas afecciones. Entre ellas están los síndromes que involucran un desarrollo incompleto o baja estatura como los de Turner y el de Prader-Willi, así como recientemente en el tratamiento de la baja estatura idiopática (Allen y Carrel 2004; Bolar *et al*. 2008). Además, se prescribe para tratar el crecimiento intrauterino retardado, deterioro de tejidos causados por SIDA, caquexia y para subsanar

la propia deficiencia de la proteína en el cuerpo humano (Jung *et al*. 2008; Krysiak *et al*. 2007). Por otro lado, existen aplicaciones de carácter cosmético o estético entre los cuales están su uso para desarrollo muscular, pérdida acelerada de peso y factor anti-envejecimiento (Neely y Rosenfeld 1994).

### 2.7. Producción y mercado de la hGH1

Los avances en la tecnología de DNA recombinante alcanzados en los años 70 hicieron posible expresar genes recombinantes vía microorganismos modificados como *E. coli*. En 1981 la compañía farmacéutica Genentech, desarrolló la primer hormona del crecimiento humano transgénica; conocida como hormona del crecimiento humano recombinante (hGHr), dejando atrás las rudimentarias formas de obtención y purificación de hGH de glándulas pituitarias de cadáveres y la utilización ineficaz de la hormona de crecimiento bovina.

Actualmente el método de producción por sistemas microbianos es el que suple la mayor parte de la oferta a nivel mundial, sin embargo, información confiable sobre el tamaño y crecimiento del mercado de la hGH son de accesibilidad restringida o difíciles de conseguir. A pesar de esto, no hay duda de que el mercado está creciendo rápidamente y que es lucrativo a juzgar por las medidas de las empresas líderes de producción mundial como Genentech, Eli Lilly y Pfizer al formar alianzas para mejorar sus niveles de producción. Por ejemplo en Estados Unidos, por cada nuevo uso y prescripción terapéutica de la hGH autorizada por la FDA (Food and Drug Administration) expande el tamaño del mercado, que en estimados conservadores llega a $22 mil millones de dólares anuales (Cuttler *et al*. 1996). Aunado a esto, el mercado es todavía más grande si se toman en cuenta las prescripciones fuera de registro y usos ilegales de la hGH.

Por otro lado, el costo por tratamiento con hGH para 1996 (Cuttler *et al*. 1996) se estimó entre 13,000 y 16,000 dólares por año durante los años que fuera necesario. Estimados más recientes fluctúan entre 20,000 y 30,000 dólares al año (Krysiak *et al*. 2007) bajo las condiciones de producción en ese momento. Estos datos apoyan lo indicado anteriormente sobre la necesidad de investigar alternativas de producción para esta y otras proteínas terapéuticas.

### 2.8. Una alternativa de producción de hGH: La biotecnología vegetal

De lo anteriormente expuesto salta a la vista la necesidad de encontrar métodos alternativos de producción de hGH y otras proteínas heterólogas en general que resulten no solo en proteínas activas y de calidad sino en menores costos para hacer asequible sus beneficios a la mayor parte de la sociedad que los requiera. En este contexto, la biotecnología vegetal representa una oportunidad de producción. Estimados indican que los costos de producción de proteínas heterólogas en plantas podrían estar entre 10 y 50 veces debajo de los costos generados por la producción de la misma proteína en cultivos de *E. coli* (Kusnadi *et al*. 1997). Otros más recientes indican que estas proteínas pueden ser producidas en sistemas vegetales entre 2 y 10% del costo por fermentación microbiana y al 0.1% del costo de obtenerlas por cultivos de células de mamífero o animales transgénicos (Hood *et al*. 2002). No obstante, pocos estudios se han hecho proyectando costos de producción utilizando cultivo de tejidos vegetales en lugar de plantas transgénicas completas. Con respecto a hGH1, ésta se ha logrado expresar satisfactoriamente en cultivos de células transgénicas en suspensión de arroz (Kim *et al*. 2008), en semillas de tabaco (Leite *et al*. 2000) y en sistemas de expresión transitoria

basados en infección con virus de plantas de tabaco (Gils *et al*. 2005), además de su expresión en cloroplastos de tabaco (Staub *et al*. 2000), con uno de los mejores rendimientos alcanzados de 7% de la proteína total soluble (PTS). Sin embargo, no se encontraron estudios sobre la producción de hGH por raíces transformadas, pero debido a sus características de producciones elevadas de metabolitos y compuestos de interés al introducir genes foráneos, con base en los resultados previos de nuestro grupo de trabajo, en este proyecto se explora la posibilidad de usar raíces transformadas de brócoli como sistema de expresión y producción de hGH1.

### 2.9. Trabajo previo: El sistema de raíces transformadas de brócoli

Como fue mencionado anteriormente, las raíces transformadas fueron generadas por transfección de material genético humano foráneo a células vegetales de brócoli vía *Agrobacterium rhizogenes*. Mediante esta técnica, en el precedente de este estudio se establecieron cultivos de raíces transformadas de brócoli útiles para estudiar la producción de proteínas heterólogas, específicamente la isoforma uno de la hormona de crecimiento humano (hGH1). Para ello se construyó el vector binario pCAMhGHE basado en el plásmido pCAMBIA1105.1 (pC1105.1) que integra el cDNA del gen de la hGH1. También fueron establecidos cultivos control de raíces no transformadas y transformados solo con la cepa silvestre de *A. rhizogenes* y con la misma cepa transformada con el vector binario pC1105.1 (García-López 2009).

La transformación de los cultivos de raíces fue confirmada por amplificación por PCR de la región de hGH1 a partir del DNA genómico y por la detección de actividad del gen reportero GUSPlus codificante para la β-glucuronidasa desarrollando el color azul intenso

característico debido a la actividad de esta enzima (Fig. 3). Siete líneas de raíces fueron positivas a ambas pruebas (García-López 2009). Los cultivos transformados y crecidos en matraz mostraron una velocidad de crecimiento (μ) de 0.84 $d^{-1}$ y un tiempo de duplicación (Td) de 1.20 d promedio. Comparados con cultivos no transformados que mostraron una μ=0.17 $d^{-1}$ y un Td=5.9 d.

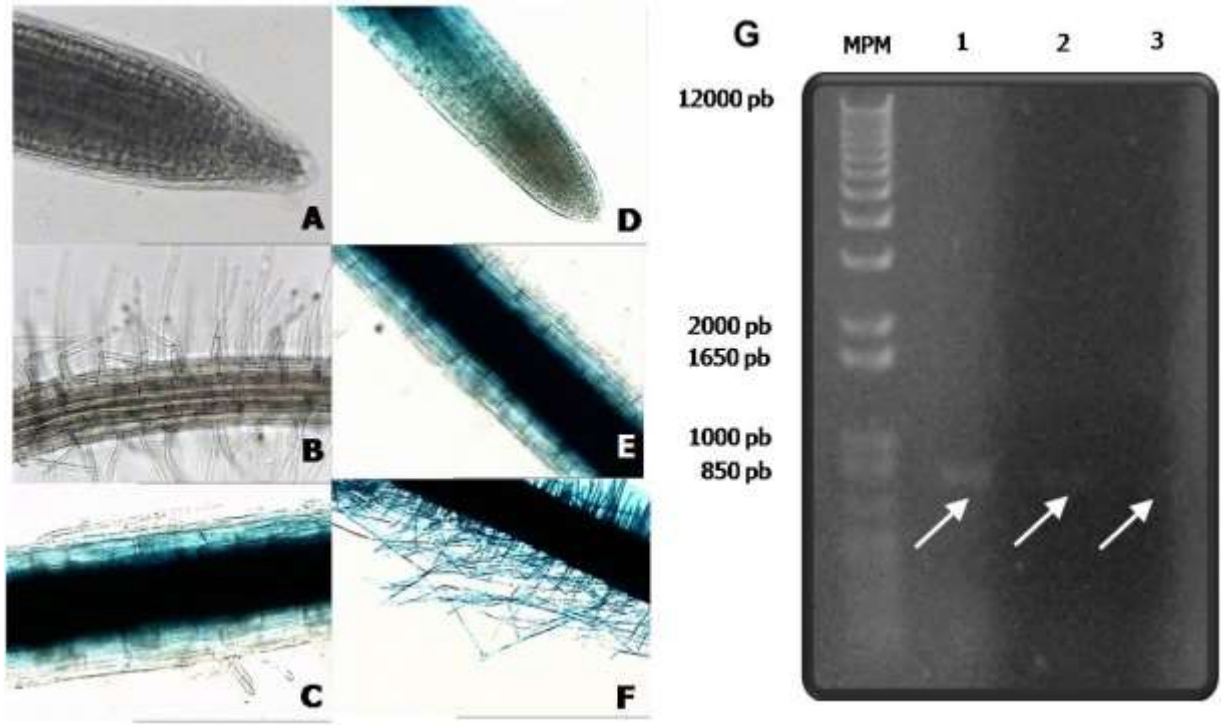


**Figura 3. Expresión de GUS en raíz no transformada (A), en raíz transformada con la cepa de *A. rhizogenes* silvestre (B), en raíz transformada con pC1105.1 (C) y en meristemo radical (D), y raíces primarias de tres líneas transformadas con la construcción pCAMhGHE (E y F). (G) Separación electroforética de los productos de amplificación del cDNA de la hGH1 (822 pb) a partir del DNA genómico extraído de tres raíces transformadas con el constructo pCAMhGHE.**

Estos datos indicaron un incremento de cuatro veces la velocidad de crecimiento por la presencia del DNA foráneo (García-López 2009). Además se encontró que los cultivos son capaces de liberar enzimas activas y estables al medio de cultivo debido a que se encontró actividad sostenida de invertasa en el medio de cultivo. El desarrollo acelerado de los cultivos transformados aunado a la expresión intensa y constitutiva del gen

reportero *GUSPlus* sugiere que el modelo de raíces transformadas de brócoli tiene potencial para la producción de proteínas heterólogas activas y sienta las bases que soportan la factibilidad técnica de este proyecto, donde se pretende la caracterización de la hGH1 transgénica, la evaluación de la capacidad biosintética y la búsqueda de condiciones básicas producción por estos cultivos.

## 3. Planteamiento del problema

La humanidad enfrenta una demanda creciente de proteínas terapéuticas y de diagnóstico, sin embargo existe una clara deficiencia para suplirlas a corto y mediano plazo con las tecnologías convencionales e instalaciones con las que se cuenta actualmente (Fischer *et al*. 2004). Por ejemplo, el mercado de hGH es de 22 mil millones de dólares y se estima un crecimiento anual conservador del 10 % (García-López 2009). Esto lleva a calcular que al precio más bajo del tratamiento de 20,000 dólares anuales (Krysiak *et al*. 2007) sólo un promedio de 1,100,000 pacientes lograrían adquirir la proteína. Con esto, queda de manifiesto la deficiencia en la oferta ya que sólo en Estados Unidos es de entre 400,000 y 1,500,000 de pacientes (Cuttler *et al*. 1996).

De lo anterior, buscar alternativas de producción de este tipo de proteínas con buenos rendimientos, bajos costos, calidad y actividad resulta imperioso. Con el potencial de la biotecnología vegetal, es posible ofrecer opciones de producción utilizando cultivos como los de raíces transformadas. Más aún existen reportes y cálculos de que los costos de producción para algunas proteínas recombinantes usando sistema vegetales, podrían estar entre 10 y 50 veces debajo de los costos generados por la producción en *E. coli* (Kusnadi *et al*. 1997). Además, que los costos de producción con plantas transgénicas pueden abatirse hasta entre 2 y 10% del costo por fermentación microbiana y al 0.1% del costo de obtenerlas por cultivos de células de mamífero o animales transgénicos (Hood *et al*. 2002).

Así, de lo presentado anteriormente, es evidente la importancia de estudiar el potencial de los cultivos de raíces transformadas para evaluar sus capacidades biosintéticas para rendir un producto proteico activo similar al nativo y eventualmente proponer una alternativa práctica y de bajos costos de producción de estas proteínas para coadyuvar a la satisfacción de las deficiencias en cuanto a la demanda de estos compuestos.

## 4. Hipótesis

La expresión del cDNA que codifica para la proteína hormona de crecimiento humano (hGH1) por raíces transformadas de *Brassica oleracea* var. *italica* producirá péptidos con características estructurales típicas a las de la isoforma1 de la proteína nativa.

# 5. Objetivos

## 5.1. General

Estudiar la expresión y producción de la isoforma 1 de la hormona del crecimiento humano por cultivos de raíces transformadas *Brassica oleracea* var*. italica* (Brócoli) para investigar su potencial como un sistema alternativo de producción de proteínas heterólogas.

## 5.2. Específicos

- Caracterizar parcialmente los cultivos de raíces transformadas
- Seleccionar líneas élite de raíces transgénicas con base a los niveles de expresión de la hGH1
- Purificar hGH1 a partir de extractos proteicos de las líneas élite
- Evaluar la producción de la hGH1 heteróloga por los cultivos en condiciones de matraz y de biorreactor de laboratorio
- Comparar las características estructurales de la hGH1 heteróloga contra las de la hGH1 nativa

## 6. Estrategia experimental

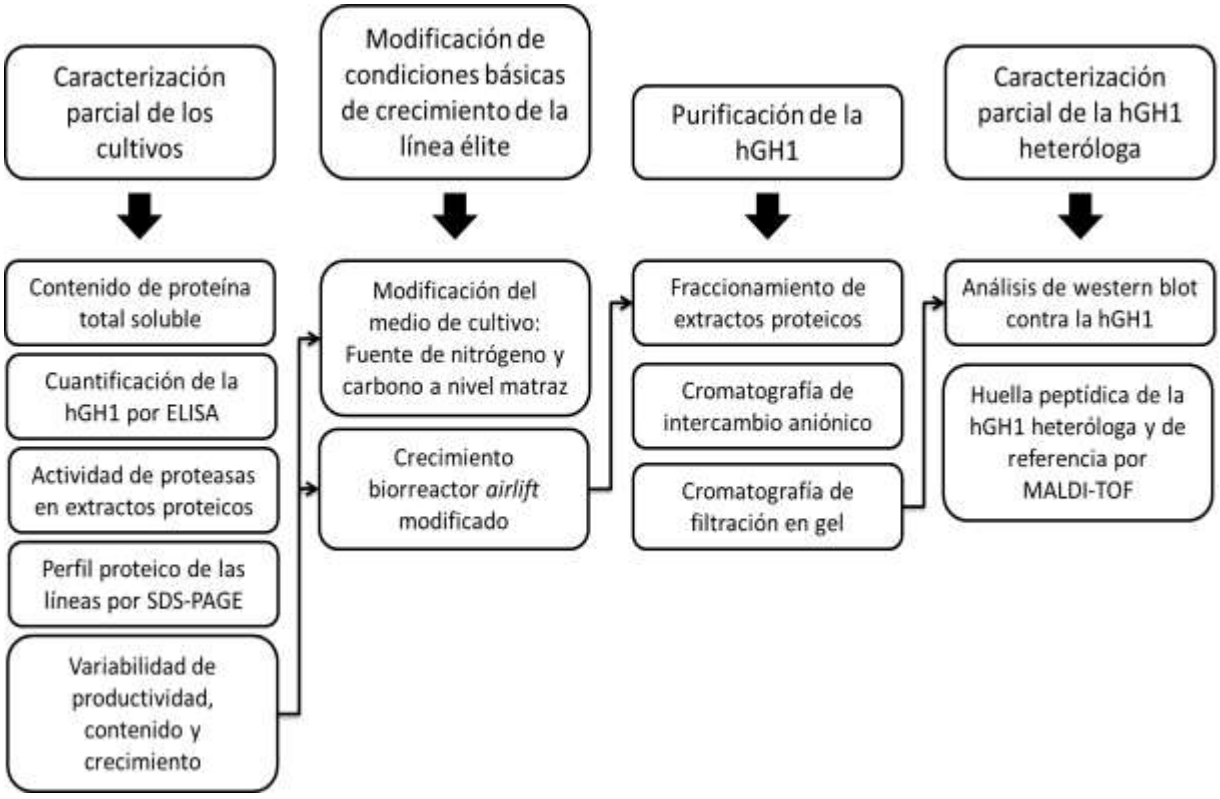


**Figura 4. Estrategia experimental utilizada en este proyecto para producir y caracterizar la hGH1 por cultivos de raíces transformadas de brócoli.**

La estrategia experimental propuesta para el desarrollo de este proyecto fue dividida en cuatro bloques. En el primero de ellos se realizó la caracterización parcial de los cultivos establecidos. Incluyó el escrutinio para encontrar líneas transformadas de un banco de líneas no confirmadas. Se encontraron 5 líneas nuevas. Se determinó y se comparó el contenido de proteína total soluble (PTS) por ensayo de Bradford y el contenido de la hGH1 por ELISA. Por otro lado también se determinó la actividad de proteasas en extractos proteicos y medio de cultivo, para inferir la integridad y estabilidad de la proteína heteróloga en los extractos. También, se estudió el perfil proteico de los extractos de las diferentes líneas por SDS-PAGE. Se comparó la variabilidad de la

productividad de la hGH1, el contenido de PTS y el crecimiento de cada línea con el fin de seleccionar una línea élite con base a su mayor acumulación de la hGH1 y crecimiento para utilizarla en los siguientes bloques experimentales.

En el segundo bloque, con la línea élite BRGHE18 seleccionada, se estudió el efecto de la modificación del medio de cultivo a nivel matraz sobre la acumulación de PTS, hGH1 y biomasa. Las modificaciones hechas fueron la variación de los niveles de fuentes de nitrógeno ($KNO_3$, y $(NH_4)_2SO_4$) y sacarosa. Se utilizó un diseño factorial de tres factores a tres niveles. Por otro lado, también se estudió el efecto de modificaciones estructurales a un biorreactor *airlift* de 1.5 L sobre la acumulación de PTS, hGH1 y biomasa. Las condiciones probadas fueron: el biorreactor sin modificaciones, solo tubo concéntrico, solo malla metálica de 1 cm de apertura y el biorreactor con ambas incorporaciones. En este experimento se siguió el consumo de sacarosa como indicador de crecimiento.

Con los cultivos obtenidos, en el tercer bloque, se hizo la extracción de proteína total y se realizó la purificación de la fracción correspondiente a hGH1. Inicialmente se realizó un fraccionamiento del extracto crudo por filtración tangencial, utilizando membranas con cortes de peso molecular de 50 y 10 kDa de manera secuencial, realizando el desalado de la muestra simultáneamente al reconstituir el volumen inicial de la muestra con buffer de intercambio y repetir el proceso de filtración. Las fracciones concentradas y acotadas entre 10 y 50 kDa se separaron por cromatografía de intercambio aniónico recuperando las fracciones cerca del tiempo de elución de la hGH1 de referencia. Las fracciones obtenidas fueron separadas por filtración en gel colectando las fracciones correspondientes a hGH1. En el cuarto bloque, la fracción acotada de la hGH1 y

colectada con alrededor de 90% de pureza fue caracterizada parcialmente. La identificación y comparación de la hGH1 heteróloga con la hGH de referencia se realizó por análisis de ELISA y western blot contra hGH1 en las muestras purificadas utilizando anticuerpos específicos. Las muestras positivas fueron analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar su huella peptídica y estructura primaria parcial para compararla con los datos reportados para la hGH1 nativa.

# 7. Materiales y métodos

## 7.1. Plásmidos

El plásmido SKII+ que contiene el cDNA de la proteína hGH1 (pBShGH) fue donado por la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez (UANL, Nuevo León, México). El vector binario pCAMBIA1105.1 (Fig. 5) que contiene el origen de replicación del vector pBR322 y el sitio *bom* para su replicación en *Escherichia coli*, el gen de resistencia bacteriano *aadA1* contra espectinomicina y estreptomicina, y el origen de replicación *pVS1* para su replicación en *Agrobacterium* (Broothaerts *et al*. 2005) fue obtenido de CambiaLabs (Brisbane, Australia). El T-DNA en este vector contiene está flanqueado por las secuencias de los bordes izquierdo (L) derecho (R) del T-DNA del plásmido de *A. tumefasciens* y contiene el gen *hptII* que confriere resistencia contra higromicina, el gen reportero *GUSPlus* y el promotor CAM35S del virus del mosaico de la coliflor. El cDNA de la hGH1 fue previamente insertado entre los sitos *Nco*I y *Bgl*II del T-DNA del vector pCAMBIA1105.1 para generar la construcción pCAMhGHE (García-López 2009).

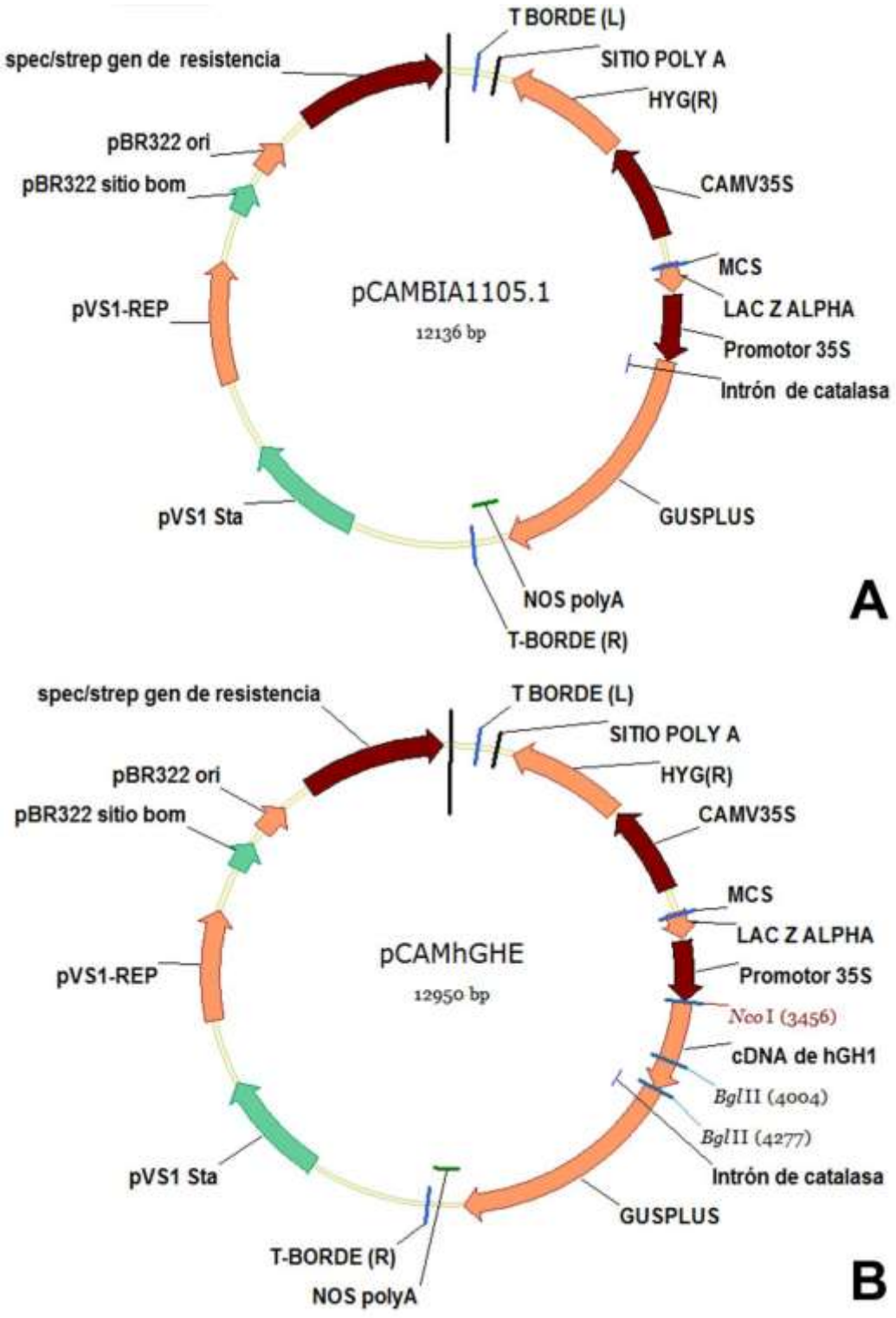


**Figura 5. Mapa de los vectores A) pCAMBIA1105.1 y B) pCAMhGHE. Ambos vectores comparten la mayoría de los componentes, pero el vector pCAMhGHE incluye la secuencia del cDNA de la hGH1 insertado entre los sitios de restricción *Nco*I y *Bgl*II.**

### 7.2. Tinción histoquímica de β-glucuronidasa

El ensayo histoquímico de la actividad de β-glucuronidasa fue utilizado para seleccionar líneas transformadas con el T-DNA de la construcción pCAMhGHE. La actividad de glucuronidasa fue determinada de acuerdo a lo reportado por Jefferson (1987) y Sundaresan *et al*. (1995), con algunas modificaciones. Los explantes de raíz (1-2 cm) fueron puestos en tubos Eppendorf de 600 µl con 250 µl de buffer de tinción GUS compuesto por 100 mM fosfato de sodio, pH 7, 10 mM EDTA (pH 8), 0.1% Tritón X-100, y 20 mM 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-glucuronato de ciclohexil-amonio; (X-Gluc, Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA). Los tubos fueron sometidos a vacío por 10 minutos en un desecador para permitir la infiltración del reactivo-sustrato X-Gluc dentro del tejido radicular. El vacío se rompió lentamente y se repitió el procedimiento 2 veces más. Después de la infiltración, los tubos fueron incubados toda la noche a 37°C. La actividad de la enzima fue observada como la aparición de un precipitado azul intenso en el tejido transformado.

### 7.3. Cultivo de raíces en matraz

Cultivos de raíces transformadas propagadas axénicamente en medio SH semisólido fueron transferidos a matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio SH líquido e incubados por 15-20 días en una agitadora orbital a 110 rpm (1 pulgada) a 25-27°C e iluminación de 8,400 lux. Cultivos de raíces no transformadas se establecieron como control a partir de explantes (1-3 cm) de plantas no transformadas. Ambos tipos de cultivo se mantuvieron y propagaron por subcultivo a medio fresco cada dos semanas.

### 7.4. Cultivo en biorreactores *airlift*

Se equipó un biorreactor *airlift* de volumen nominal de 1.5 litros y se montó bajo tres configuraciones: con tubo de arrastre, con malla metálica y con tubo de arrastre más malla. Como malla de utilizó un cilindro de acero inoxidable con aperturas de 1 $cm^2$ que se sostuvo entre el tubo de arrastre de vidrio y la jarra del biorreactor, según lo reportado por Rodríguez-Mendiola *et al*., (1991). Las relaciones geométricas del rector tuvieron los siguientes valores: relación altura/diámetro de 21.3:9.7 cm (2.19), relación entre la altura del biorreactor/altura de la malla cilíndrica 9.7:7.8 cm (1.24). Los biorreactores se prepararon con 1.25 L de medio de cultivo SH suplementado con sacarosa 30 g/L y $(NH_4)_2SO_4$ 300mg/L (2.3 mM). Se esterilizaron en autoclave a 121°C por 20 minutos. Los biorreactores fueron inoculados con 4 g/L de raíces transformadas fragmentadas, crecidas previamente por 15 días en matraces de 125 mL que contenían medio SH. El cultivo en biorreactor se mantuvo a 27 ± 2 °C, 800 lux, y 0.2 vvm de aireación. El muestreo de medio de cultivo del biorreactor se realizó retirando 10 mL del medio a través de un puerto de muestreo al vacío cada 3 días. Después de los 24 días de cultivo, la totalidad de la biomasa del biorreactor se colectó, se lavó en agua estéril desionizada y se pesó. Esta biomasa fue utilizada para la extracción de proteína total soluble y los experimentos de purificación de la hGH1.

### 7.5. Determinación de peso fresco y peso seco

El peso fresco de la biomasa en los matraces o proveniente de biorreactor, se determinó después de lavar el tejido radicular con agua destilada estéril y puesta sobre papel

absorbente. El peso seco se determinó después de haber secado las raíces por exposición a 90°C durante 24 horas en un horno de laboratorio.

### 7.6. Determinación de azúcares totales y reductores

La determinación de consumo de sacarosa en el medio de cultivo se realizó utilizando la técnica del ácido dinitrosalicílico DNS (Miller 1959) y el método de fenol-sulfúrico para azúcares totales (DuBois *et al*. 1956).

### 7.7. Extracción de proteína total soluble (PTS)

La biomasa fresca fue lavada con agua destilada estéril, drenada y pesada. El tejido pesado fue congelado con nitrógeno líquido y pulverizado en un mortero frío. Por cada gramo de tejido pulverizado se adicionaron 3 ml de buffer de extracción (25 mM Tris-HCl pH 7, 2mM EDTA, 1 mM DTT, 1.5% p/v PVPP, 1.6 mM PMSF y 0.25% v/v Tritón X-100). La mezcla se puso en agitación durante 1 hora a 4°C y después se centrifugó a 8,900 xg por 20 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se determinó la cantidad de proteína total por el método de Bradford (Bradford 1976). La muestra fue adicionada con 10% de glicerol estéril y mantenida a -80°C hasta su análisis.

### 7.8. Determinación de actividad proteolítica

La determinación de actividad proteolítica se realizó de acuerdo al método reportado por Xu *et al*. (2000) con algunas modificaciones. Una muestra de 450 µl, de extracto de PTS o medio de cultivo, se mezcló e incubó con 50 µl de albúmina sérica bovina 1% (BSA) en buffer de acetato de sodio 100 mM (pH 4) a 37°C por 30 minutos. La reacción se detuvo al adicionar 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Las muestras se incubaron en

hielo por 30 min y la mezcla se centrifugó a 3,340 x g, por 5 min. Los sobrenadantes fueron recuperados y su absorbancia medida a 280 nm. Una unidad de actividad proteolítica fue definida como el cambio de 1 unidad de absorbancia por hora a 280 nm por ml de extracto.

### 7.9. Extracción de DNA genómico a partir de raíces transformadas

El DNA genómico de las células de raíces fue extraído basado en los protocolos reportados por Edwards *et al*. (1991), y Kang y Yang (2004), con algunas modificaciones. Aproximadamente 0.5 g de tejido fresco se congeló con nitrógeno líquido y se homogenizó en mortero frío con 2 ml de buffer de extracción de DNA (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCL pH 7.5, 50 mM EDTA pH 7.5 y 1.5% polivinilpolipirrolidona). Después, se agregaron 200 µl de SDS al 20% y la mezcla se agitó 30 s en un vortex, y se incubó a 65°C por 10 min. Esta mezcla se centrifugó a 8,900 g por 10 min a 4°C y los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos. A continuación se agregó un volumen igual de una mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Se agitó por 30 s en vortex y se centrifugó a 15,600 xg por 5 min a 4°C. El sobrenadante, que contenía el DNA genómico, fue recuperado y la cantidad y pureza se determinó a través de la medición de las relaciones A260/A280, A260/A230, respectivamente.

### 7.10. Fraccionamiento de la PTS

Los extractos de proteína total soluble fueron fraccionados con tubos para filtración tangencial AMICON Ultra (millipore) con dos tamaños de poro de membrana 50 y 10 kDa. Las muestras crudas de la PTS fueron centrifugadas primero en el tubo de 50 kDa y los diafiltrados fueron colectados y centrifugados nuevamente en los tubos de 10 kDa (2,400

g por 30 minutos). El diafiltrado con la fracción de proteína menor a 10 kDa fue colectado y desalado. Para desalar los retenidos fueron reconstituidos al volumen inicial de la muestra con buffer de fosfatos 20 mM pH 7 y centrifugados hasta el volumen inicial del retenido. Este procedimiento se repitió 3 veces.

### 7.11. Determinación de la hGH1 por ELISA

La presencia de la hGH1 en los extractos proteicos crudos y fracciones proteicas purificadas provenientes de raíces, se determinó por inmunoensayo tipo ELISA utilizando el kit de Invitrogen KAQ1081 (NY, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este kit permite la determinación cuantitativa de la hGH1 por medio de un inmunoensayo EASIA (Enzyme Amplified Sensitivity Immuno Assay) en fase sólida. La hGH1 presente en las muestras se une a anticuerpos monoclonales (mAbs1) inmovilizados en la superficie de los pozos de las placas de ELISA y con anticuerpos monoclonales (mAbs2) conjugados con peroxidasa de rábano (HRP). Después del periodo de incubación para formar el complejo mAbs1-hGH1-mAbs2-HRP (Sandwich) los pozos son lavados para remover los anticuerpos libres y agregar la solución de sustrato de la peroxidasa (tetrametilbenzidina TMB + $H_2O_2$). Después de parar la reacción con $H_2SO_4$ se lee la absorbancia a 450 nm. La cantidad de hGH se estima por interpolación en una curva estándar de hGH proveída con el kit.

### 7.12. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Las separaciones de proteína se llevaron a cabo en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli 1970) en geles de acrilamida al 15% (Tabla 2).

**Tabla 2. Formulación de los geles usados para SDS-PAGE**

| | Gel concentrador | Gel separador |
|---|---|---|
| Componente | Volumen (ml) | Volumen (ml) |
| **Acrilamida/Bisacrilamida 30% (29:1)** | **0.83** | **5** |
| **Buffer concentrador 4x (0.5 M Trizma 0.4% SDS)** | **1.3** | |
| **Buffer separador 4x (1.5 M Trizma 0.4% SDS)** | | **2.5** |
| **Agua miliQ** | **2.9** | **2.4** |
| **Persulfato de amonio 10% (µl)** | **50** | **100** |
| **TEMED (µl)** | **5** | **4** |
| Volumen Final | **5 ml** | **10 ml** |

Las muestras, con un contenido conocido de proteína, fueron cargadas (aprox. 20 µl, 25-30 µg) en una proporción 1:1 con buffer de carga (125 mM Trizma, 4% SDS, 20% Glicerol, 20% 2-mercaptoetanol) y resueltas a voltaje constante de 200 V por 40 min. Se utilizó el buffer de corrida, 25 mM Trizma, 192 mM glicina, 1% SDS.

### 7.13. Detección de hGH1 por western blot

Las fracciones y muestras purificadas de proteína fueron resueltas en geles de acrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes como se mencionó anteriormente. Las muestras separadas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Fluoruro de polivilideno) en una cámara de electro-transferencia a 275 mA por 75 min (gel de 1mm de grosor). Después se bloquearon los sitios no específicos en la membrana al sumergirla toda la noche en una solución de leche descremada 5% en buffer PBS-T (Buffer salino de fosfatos, 0.05% Tween). Seguidamente, se realizaron tres lavados de cinco minutos con buffer PBS-T a la membrana. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-hormona de crecimiento humano (Santa Cruz Biotechnology Inc. California, USA) diluido 1:200 en PBS-T por una hora en agitación suave a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS-T por 10 min, la membrana se

incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Pennsylvania, USA) diluido 1:15,000 en PBS-T por 45 min. Tras seis lavados de 10 min con buffer PBS-T, se procedió a la detección de la proteína blanco por quimioluminiscencia en placas de rayos X. La detección se realizó entre 1 y 5 minutos de exposición.

### 7.14. Purificación de la hGH1

Las fracciones entre 10 y 50 kDa (aprox. 6 mg/ml) desaladas y a pH 7, obtenidas por filtración tangencial, se aplicaron a una columna HiPrep 16/10 Q FF (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) de intercambio aniónico equilibrada con 5 volúmenes de columna (CVs) del buffer A (20 mM fosfatos pH 7, 50 mM NaCl). La proteína no unida se lavó de la columna con 2 CVs del buffer A y la proteína retenida se eluyó con un gradiente lineal de 0-100% de buffer B (20 mM fosfatos pH 7, 1 M NaCl) por 20 CVs. Las fracciones eluídas alrededor del tiempo de elución estimado previamente con hGH1 estándar, se colectaron, liofilizaron, reconstituyeron y se diafiltraron para desalarlas. Posteriormente, estas fracciones se cargaron en una columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) de exclusión molecular equilibrada con 2 CVs de buffer A' (50 mM fosfatos pH 7, 150 mM NaCl). La muestra se eluyó isocráticamente con el buffer A' por 1.5 CVs. Las fracciones eluídas cerca del tiempo de elución del estándar de la hGH1 se colectaron y fueron analizadas por ELISA y espectrometría de masas MALDI-TOF.

### 7.15. Tinciones de proteínas en geles de poliacrilamida

Se usaron dos técnicas compatibles con la metodología para análisis por MS MALDI-TOF: Tinción con nitrato de plata y con azul de Coomassie.

**Tinción de nitrato de plata**. Los geles PAGE se fijaron con una solución de ácido acético al 5% y metanol 50% por 30 minutos, seguido de un lavado en metanol al 50% por 15 min y 15 min en agua mili Q. Se sensibilizaron al sumergirlos en una solución de tiosulfato de sodio al 0.01% por 1 minuto, y se lavaron dos veces por 1 minuto en agua mili Q. Se sumergieron en una solución de nitrato de plata al 0.1% durante 20 minutos con agitación suave y se lavaron posteriormente 2 veces con agua mili Q por 1 minuto. Para el revelado de las bandas de proteína se sumergieron los geles en una solución de carbonato de sodio al 2% en formalina al 0.04%.

**Tinción de Coomassie**. Se sumergió el gel en una solución de azul de Coomassie G-250 al 0.1 % en Metanol al 50 % y 10% Ácido Acético (en agua mili Q) durante 1 hora. Se retiró el gel del colorante y se procedió a la destinción del gel en una solución de metanol al 40% realizando cambios frecuentes de esta solución cuando tomaba intenso color azul.

### 7.16. Digestión Tríptica y extracción de péptidos

Los geles teñidos y resueltos como se describió anteriormente, las bandas correspondientes al peso molecular de la hGH1 se cortaron con una hoja de bisturí, se depositaron en tubos Eppendorf y se sumergieron 2 veces en agua mili Q durante 10 min para su lavado. El protocolo que se siguió fue basado en lo descrito por Jimenez *et al*. (2001) y Huynh *et al*. (2009). Para desteñir los geles teñidos con plata, las bandas recortadas se cubrieron con una solución 30 mM de ferrocianuro potásico y 100 mM de tiosulfato de sodio; y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con agua mili Q por 1 min. Las bandas se cubrieron con acetonitrilo (AcN) y se dejaron reposar 5 minutos para deshidratar el gel; esta operación se repitió dos veces. Se

retiró el AcN y se añadió $NH_4HCO_3$ 25 mM para cubrir las bandas y se incubó 5 min a temperatura ambiente tras los cuales sin retirar el sobrenadante se añadió un volumen igual de AcN y se incubó otros 15 min. A continuación se llevó a sequedad en centrífuga "speed-vac". Posteriormente, se cubrieron las bandas con una solución 10 mM Di-tio-treitol (DTT) en $NH_4HCO_3$ 25 mM por 30 min a 56°C para la reducción de los péptidos. Se dejó reposar hasta llegar a temperatura ambiente, se eliminó la solución de DTT y para la alquilación de los péptidos se añadió AcN que se retiró inmediatamente para incubar con yodoacetamida 55mM en 25 mM $NH_4HCO_3$ durante 15 min en oscuridad.

Para la digestión de la hGH1, se añadió tripsina a 12.5 ng/ml en 25 mM de $NH_4HCO_3$ hasta cubrir las bandas y se incubó en hielo 45 min para que se absorbiera pero sin que llegara a actuar. A continuación se retiró el sobrenadante y se añadió $NH_4HCO_3$ 25 mM hasta cubrir las bandas y se incubó toda la noche a 37°C. Tras la digestión se agitó la mezcla con vortex, se centrifugó y se descartó el sobrenadante.

Para la extracción de los péptidos de gel, las bandas se cubrieron con 50% AcN, 0.5% ácido trifluoroacético (TFA) y la mezcla se sonicó 10 min. Se recuperó el sobrenadante en otro tubo. Esta operación se repitió 3 veces, se juntaron los sobrenadantes. De los geles se hicieron otras tres extracciones con AcN puro por 10 min cada una y se unieron los sobrenadantes con los de las tres extracciones anteriores. Esta mezcla se llevó a sequedad por centrifugación al vacío "speed-vac" y el residuo se resuspendió en 10 µl de 50% AcN en 0.1% TFA, para su análisis por MS MALDI-TOF.

## 7.17. Análisis MS MALDI-TOF para la identificación y caracterización de la proteína hGH1 transgénica

Las muestras digeridas en gel fueron desaladas usando puntas de pipeta ZipTip C18 (Millipore, MA, USA), mezcladas con el compuesto matriz (8 mg/ml α-ciano-ácido 4-hidroxicinámico) y depositadas en una placa de MALDI. Las muestras en la placa se analizaron de acuerdo a lo reportado por Ye *et al*. (2010) en un equipo 4800 plus MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems, CA, USA). Los espectros de masas se adquirieron en el intervalo de 800-4000 m/z en modalidad iónica positiva. La identificación y caracterización de los péptidos fue hecha mediante secuenciación peptídica y análisis de comparación de masas iónicas como fue descrito por Henzel *et al*. (1993) y Clauser *et al*. (1995), usando la base de datos de SwissProt y el software ProteinPilot (Applied Biosystems, CA, USA).

## 7.18. Análisis estadístico

Se usó el programa SPSSV.10 (SPSS Inc, 2005), Microsoft Excel 2007, Minitab 16 (Minitab Inc, 2012) y SigmaPlot 11 (Systat Software Inc, 2010) para realizar los análisis estadísticos y análisis gráfico. La comparación múltiple de medias fue realizada usando el modelo lineal general y la prueba de Tukey para evaluar diferencias significativas entre los tratamientos. El nivel de significancia α fue fijado en 0.05.

# 8. Resultados

## 8.1. Establecimiento de cultivos de raíces transformadas

### 8.1.1. Confirmación de líneas transformadas con pCAMhGHE

En estudios previos a este trabajo, se habían establecido 7 líneas transformadas con el T-DNA del vector pCAMhGHE que lleva el cDNA de la hGH1. La transformación de estas líneas se confirmó mediante la expresión del gen reportero *GUSplus* y su resistencia a la presencia de higromicina (García-López 2009), antibiótico que inhibe la síntesis proteica en eucariotas y no permite el crecimiento de tejido no transformado (Broothaerts *et al*. 2005).

Además de los cultivos anteriores, se establecieron otros transformados con el cDNA de la hGH1 por lo que se realizó un escrutinio posterior de estas nuevas líneas de raíces mediante la tinción histológica debida a la expresión del gen reportero de β-glucuronidasa y resistencia a higromicina debido a la presencia del gen *hptII*. Este análisis histológico de GUS permitió identificar 5 líneas transformadas adicionales con estas características (Fig. 6). Como puede observarse estas raíces mostraron el fenotipo característico de las raíces transformadas; gran pilosidad y ramificación, y crecimiento acelerado comparado con las raíces no transformadas. Con estas líneas se integró un total de doce cultivos de raíces transformadas que se utilizaron para el desarrollo de este estudio.

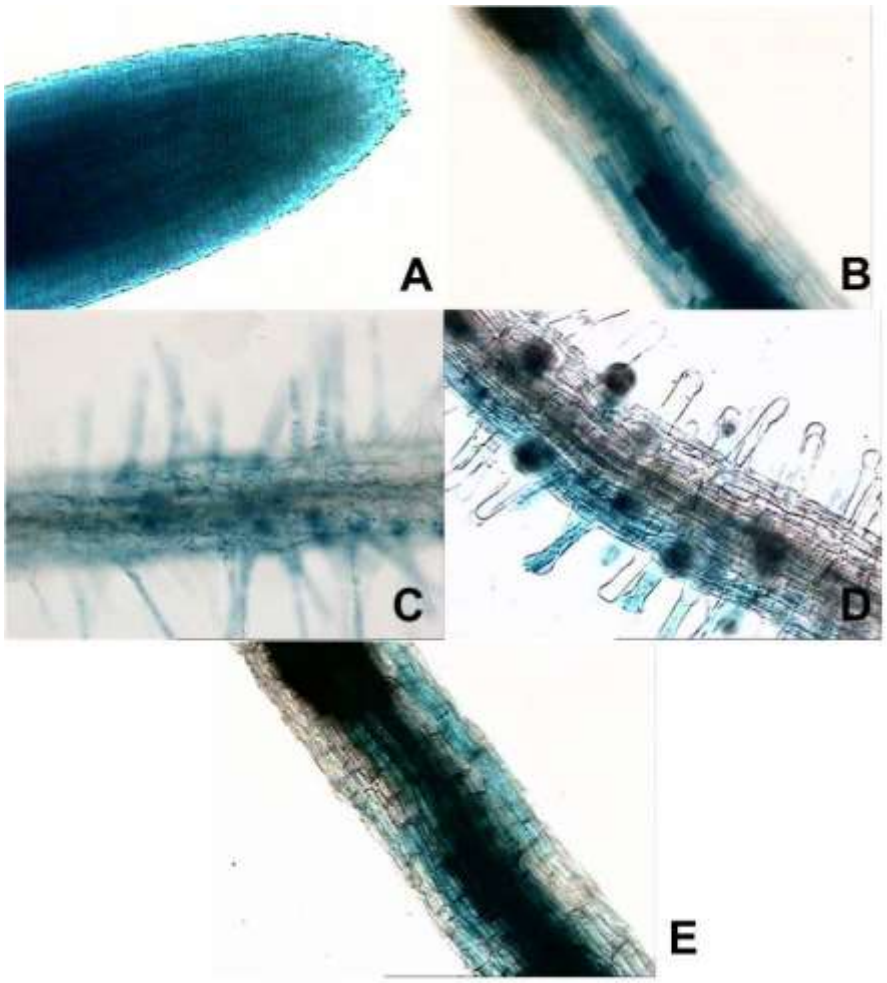


**Figura 6. Líneas transformadas con el vector pCAMhGHE. En las fotografías se hace notar la presencia de la coloración azul resultado de la actividad de β-glucuronidasa. A) BRGHE16, B) BRGHE17, C) BRGHE18, D) BRGHE20 y E) BRGHE22.**

### 8.1.2. Contenido de proteína total soluble en cultivos de raíces

Se realizó la extracción de proteína total soluble (PTS) a partir de la biomasa y del medio de cultivo de los cultivos de raíces transformadas que conformaron el banco del estudio mencionado anteriormente y de los no transformados usados como control. Después de cuantificada la distribución de PTS en biomasa y medio de cultivo con respecto al crecimiento (Fig. 7) se usó un inmunoensayo (ELISA) para evaluar la cantidad correspondiente a la hGH1 en relación al crecimiento de las 12 líneas establecidas (Fig.

8). Esta determinación permitió a su vez calcular la productividad de cada uno de los cultivos (Tabla 3). La proteína total soluble osciló entre 1 - 2.3 mg proteína/g biomasa fresca y entre 100 a 480 μg/g biomasa fresca en el medio de cultivo (Fig. 7). Los bajos contenidos de PTS en el medio de cultivo indican que las raíces transformadas no secretan cantidades importantes de proteínas, a pesar que en estudios anteriores (García-López 2009) se pudieron detectar actividades enzimáticas notables de invertasa y β-glucuronidasa en medio de cultivo, por la hidrólisis de sacarosa y coloración azul en el medio de cultivo.

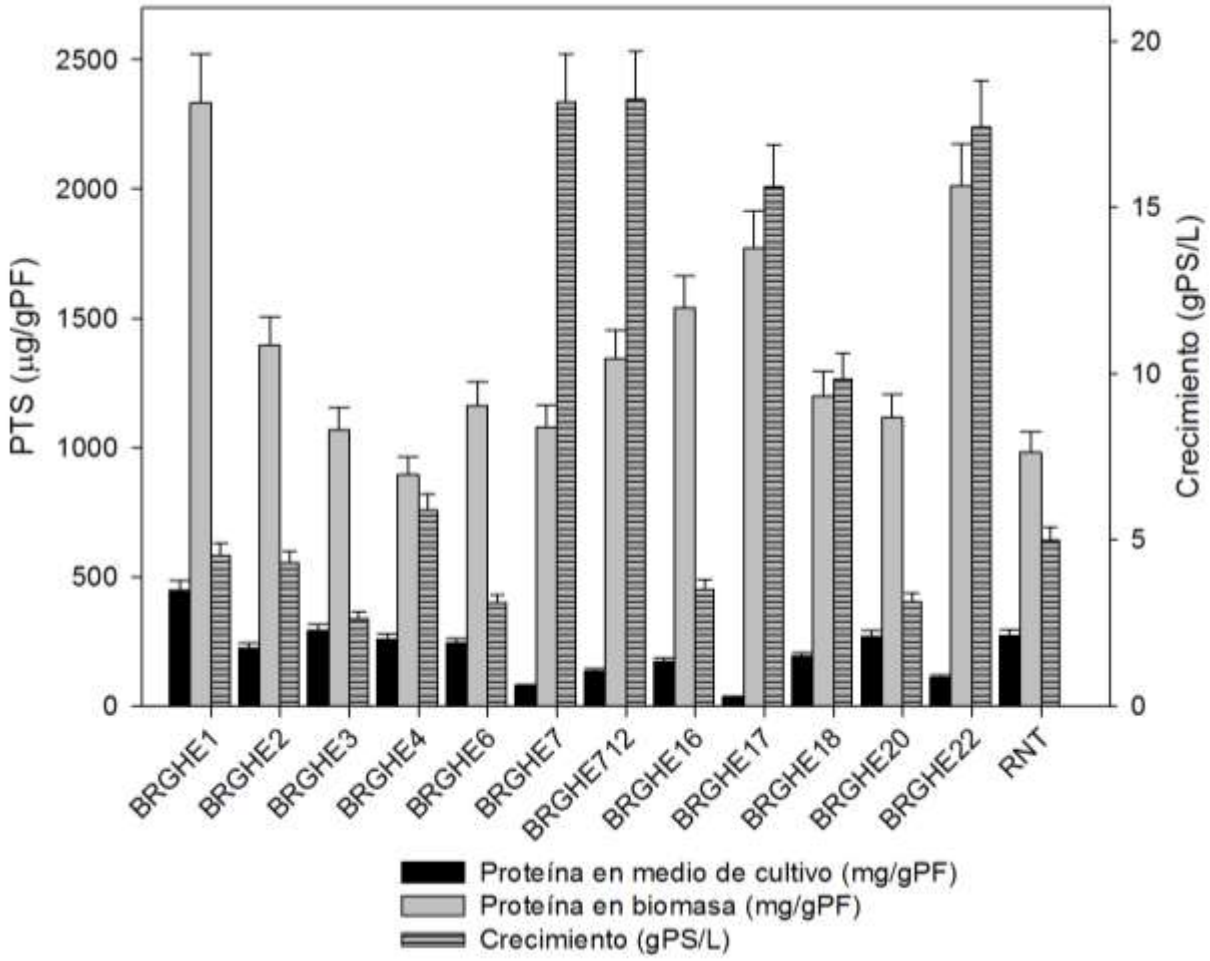


**Figura 7. Crecimiento y distribución de proteína total soluble en medio de cultivo y biomasa de los cultivos de raíces transformados en comparación con los de raíces no transformadas (RNT) después de 15 días de cultivo.**

Como puede observarse en la figura 7, la mayoría de los cultivos transformados acumulan igual o mayor cantidad de PTS que el cultivo de raíces no transformadas (RNT). No obstante, las diferencias en el contenido fueron significativamente notables entre los cultivos. Estas diferencias pueden ser primordialmente atribuidas a disturbios metabólicos generados por la agrotransformación, que involucra la integración aleatoria del T-DNA de pCAMhGHE en cada línea. Esta variabilidad genética y metabólica genera diferencias entre estos cultivos a varios niveles, por ejemplo expresión de proteína y velocidad de crecimiento, además de la acumulación de proteína total, características que influyen en la selección de líneas de raíces élite para su estudio en las etapas siguientes del proyecto.

### 8.1.3. Contenido de la hGH1 en raíces transformadas

Los extractos de PTS de las doce líneas de raíces establecidas, fueron analizados por inmunoensayos EASIA tipo ELISA utilizando anticuerpos específicos contra hGH1. Se detectó la proteína hGH1 en 10 de los 12 cultivos transformados mostrando contenidos entre 0.2 y 10 μg/g biomasa seca (Fig. 8). Este rango corresponde al 0.0015-0.9% de la proteína total soluble (PTS). Cabe mencionar que las líneas 4 y 12 mostraron señales similares a las observadas en RNT, las cuales pueden ser consideradas señales de ruido o basales y no por la presencia de la hGH1. Estos contenidos son similares con algunos reportados para otras proteínas heterólogas expresadas en raíces transformadas, los cuales varían entre 0.0026% y 4% de PTS (Doran 2006a; Kwon *et al*. 2003).

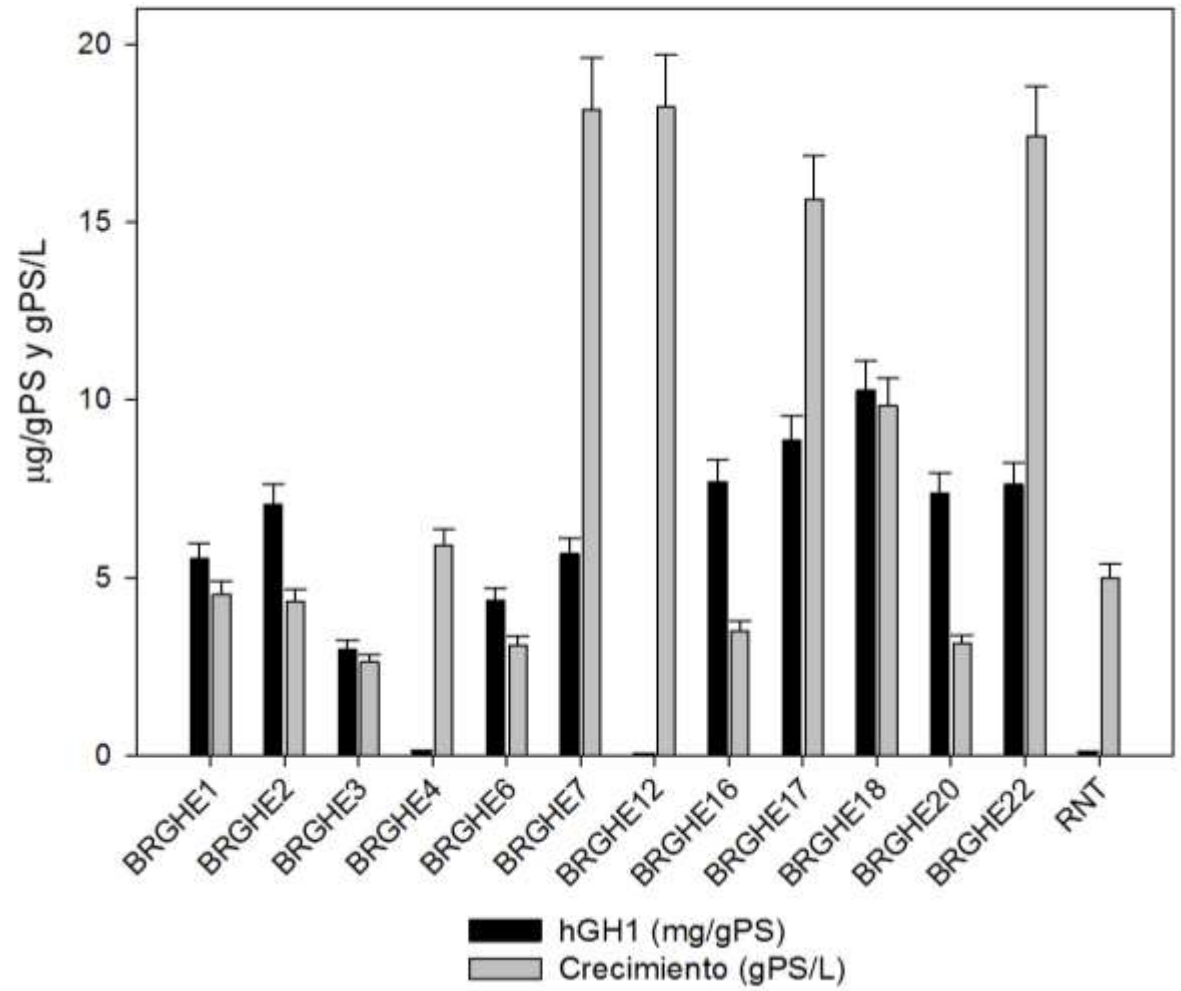


**Figura 8. Crecimiento y producción de la hGH1 en cultivos de raíces transformados y raíces no transformadas.**

La presencia de la hGH1 en el tejido no sólo demuestra la transformación del tejido y expresión de la proteína, sino que permite sugerir que la proteína podría poseer actividad biológica, dado que los anticuerpos pueden poseer especificidad tridimensional. De hecho, existen reportes de anticuerpos anti hGH1 que permiten correlacionar directamente su detección con la estructura tridimensional adecuada y por ende con su actividad biológica (Moura *et al*. 2004).

### 8.1.4. Selección de una línea élite en base a su producción de la hGH1

Dada la variabilidad en el crecimiento entre las líneas de raíces y en su producción de la hGH1 debido a la transformación genética (Twyman *et al*. 2003; Tzfira y Citovsky 2006), se realizó una comparación entre el contenido y la productividad de la hGH1 en los cultivos para seleccionar líneas élite de producción. Con base en estos resultados se buscó seleccionar una de ellas para continuar los estudios que buscaron proponer el establecimiento de un bioproceso para la producción de la proteína hGH1. Se encontró amplia variabilidad en la productividad de la hGH1 entre los cultivos y que el crecimiento no está en relación directa con la producción de la hGH1 (Fig. 8). El crecimiento de las líneas transformadas con hGH1 fue usualmente similar o superior al mostrado por los cultivos no transformados (RNT) y transformados con el vector pCAMBIA1105.1 (C). Después de analizar estadísticamente los datos, se observó que el coeficiente de variación para los contenidos de la hGH1 dentro de las mismas líneas fue usualmente menos del 10% (CV máximo 10.9% para la línea BRGHE7). No obstante, la variación entre cultivos fue alta (STD 3.3 µg hGH1/g PS; CV 56.7 %), oscilando de 0.2 µg hGH1/g PS en dos líneas (4 y 12) a 10 µg hGH1/g PS en la línea 18. La productividad se comportó de la misma manera. En términos de productividad, la línea 17 produjo 0.55 ± 0.01 µg hGH1/g PS/d (Tabla 3), mientras que la línea 18 produjo significativamente más (0.64 ± 0.02 µg hGH1/g PS/d) ($\alpha$= 0.05).

**Tabla 3. Productividad de la hGH1 por raíces transformadas con el T-DNA de la construcción pCAMhGHE**

| | µg hGH/gPS*d | | µg hGH/gPS*d |
|---|---|---|---|
| **BRGHE1** | 0.276 ± 0.017 | **BRGHE12** | 0.003 ± 0.001 |
| **BRGHE2** | 0.353 ± 0.015 | **BRGHE16** | 0.385 ± 0.018 |
| **BRGHE3** | 0.150 ± 0.010 | **BRGHE17** | 0.553 ± 0.011 |
| **BRGHE4** | 0.007 ± 0.001 | **BRGHE18** | 0.641 ± 0.015 |
| **BRGHE6** | 0.218 ± 0.009 | **BRGHE20** | 0.368 ± 0.006 |
| **BRGHE7** | 0.283 ± 0.012 | **BRGHE22** | 0.381 ± 0.005 |

En la literatura hay reportados valores de productividad para numerosas proteínas heterólogas expresadas a partir de diversos sistemas vegetales y plantas transgénicas, que van desde 50 ng/gPS*d hasta 20 µg/gPS*d (Banerjee *et al*. 2002; Sharp y Doran 2001; Wongsamuth y Doran 1997), por lo que las productividades encontradas en este proyecto están dentro de lo reportado. No obstante se debe tener en cuenta que el crecimiento y acumulación de proteína por las líneas celulares de este trabajo no han sido optimizados, ni tampoco las condiciones de cultivo para producción, es decir el trabajo en este aspecto está aún en desarrollo.

### 8.1.5. Actividad de proteasas en medio de cultivo

Dentro de las actividades para la caracterización de las líneas de raíces transformadas, se determinó la actividad de proteasas en el medio de cultivo debido a que estas enzimas están involucradas directamente con la integridad y estabilidad de la proteína heteróloga, tanto la liberada en el medio de cultivo como la intracelular. Se encontró que las 12 líneas establecidas presentan valores similares de actividad específica de proteasas extracelulares, diferente al comportamiento aleatorio en la actividad intracelular (Fig. 9). Este comportamiento puede ser también atribuido a las diferencias metabólicas entre los cultivos.

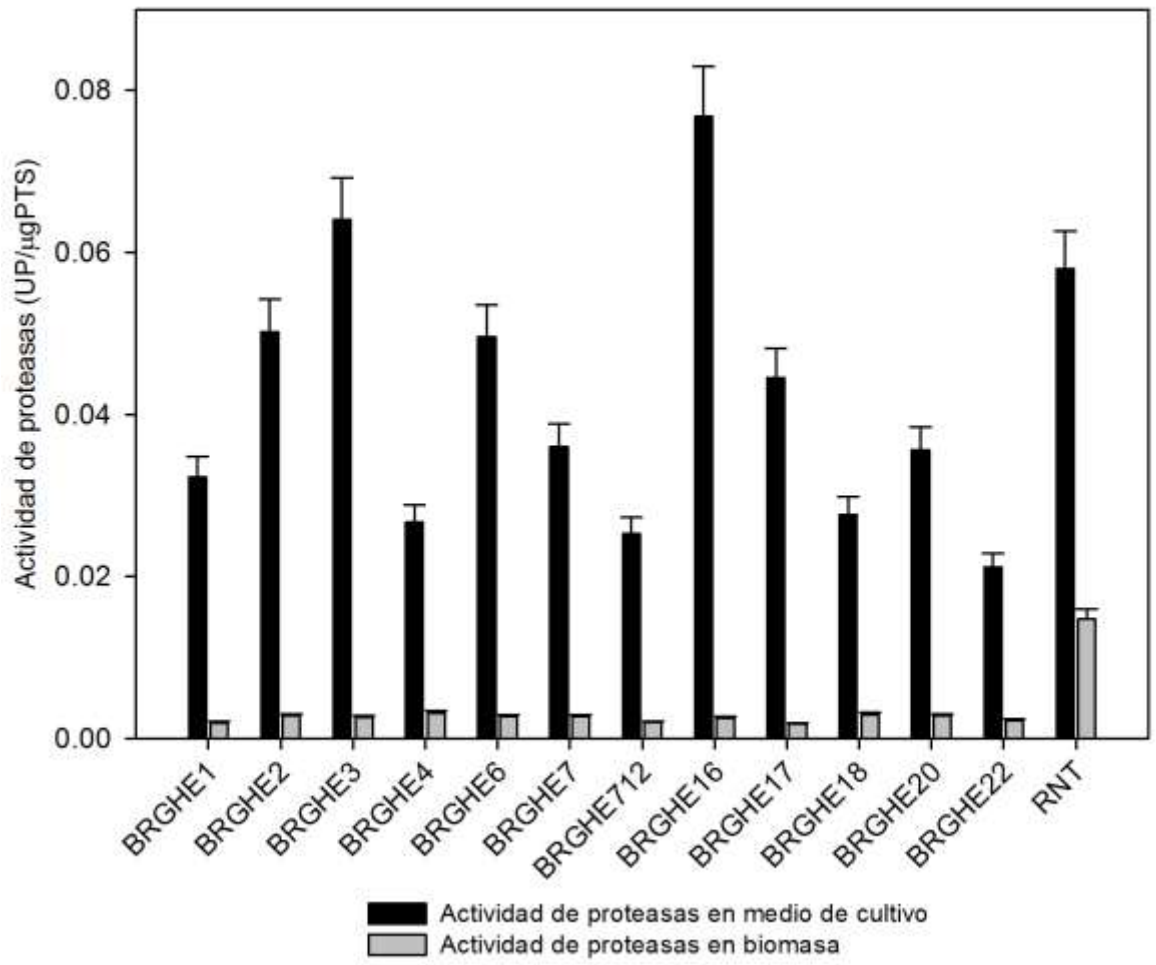


**Figura 9. Actividad de proteasas en medio de cultivo y en biomasa de líneas de raíces transformadas y no transformadas.**

La actividad específica de proteasas en los cultivos de las líneas transformadas fue en promedio 0.046 U/$\mu g_{prot}$. Este valor es muy cercano al obtenido para cultivos de raíces no transformadas (0.058 U/$\mu g_{prot}$). En general la actividad en biomasa fue aproximadamente diez veces mayor a la que se determinó en medio de cultivo; lo que es comprensible debido a que la cantidad de proteína total a la que son referidas las unidades de actividad volumétrica, fue mucho mayor en el extracto de biomasa. De cualquier manera, estos valores de actividad proteolítica son considerablemente bajos respecto a lo observado en

otros sistemas de expresión vegetal (Doran 2006a), lo que resulta adecuado para la preservación de la integridad de las proteínas en los cultivos, entre ellas la hGH1 heteróloga. Existen reportes sobre la estabilidad de proteínas heterólogas en sistemas vegetales, específicamente en raíces transformadas de tabaco, que muestran que con valores por debajo de una unidad específica de proteasa la estabilidad no se ve significativamente comprometida (Doran 2006b; Terashima *et al*. 1999; Trexler *et al*. 2002).

### 8.1.6. Perfil de proteínas en extractos de PTS de raíces transformadas

Una vez obtenidos los extractos de PTS de los cultivos de raíces, se separaron mediante SDS–PAGE para analizar el perfil proteico (Fig. 10). Como se esperaba, la composición fue de un perfil complejo con proteínas entre 6 y 212 kDa. Sin embargo, se encontraron bandas con tamaños cercanos a las proteínas heterólogas codificadas en el T-DNA introducido, como son la higromicin-fosfotransferasa (HPT) codificada por el gen *hptII* (38 kDa), β-glucuronidasa (BGL) por el gen *GUSPlus* (69 kDa) y hGH1 por su cDNA (22kDa). Además se observaron diferencias en los patrones y distribución de proteínas entre las líneas transformadas y las raíces no transformadas. Es decir, bandas presentes en algunas líneas y ausentes en otras. Estas diferencias en el perfil proteico posiblemente estén relacionadas con la variabilidad en la expresión genética debido a la posición del genoma vegetal donde se insertó el T-DNA y al número de copias de este T-DNA en cada línea (Tzfira y Citovsky 2006).

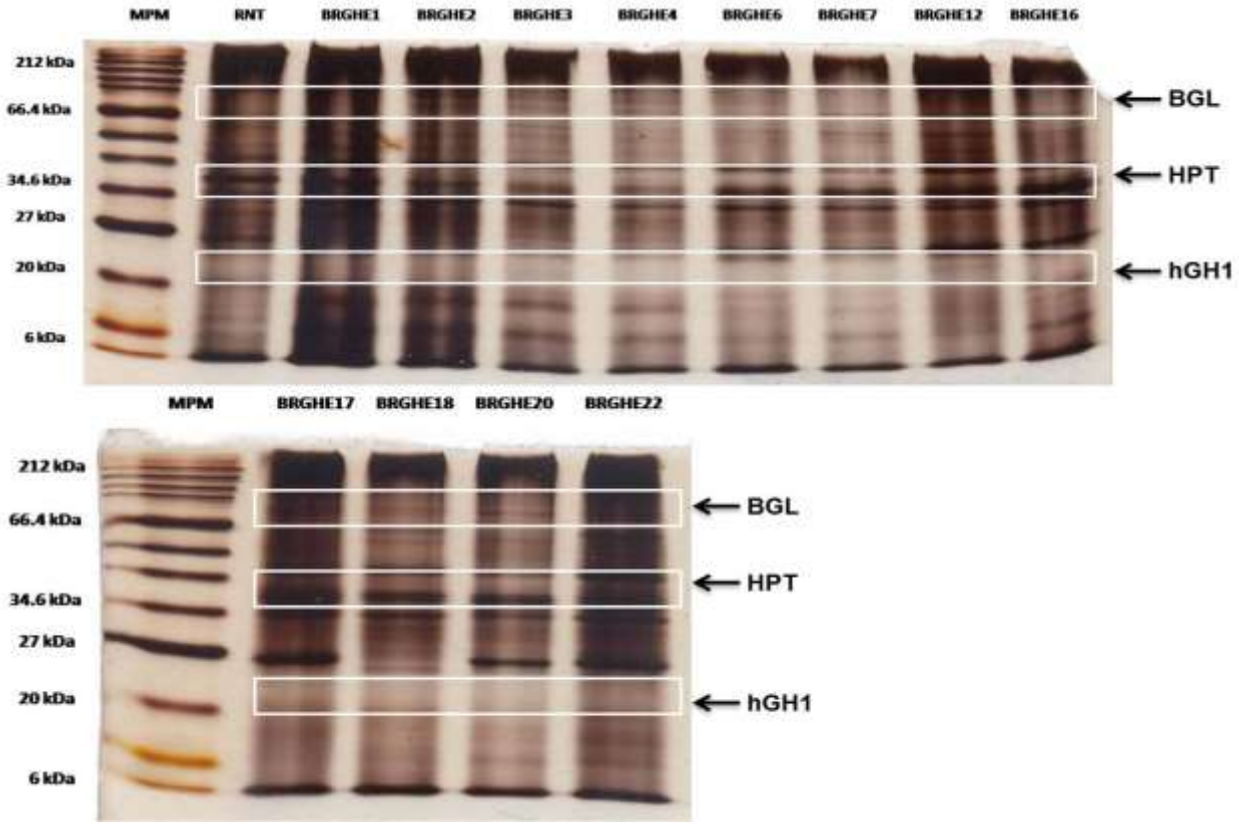


**Figura 10. Perfil de proteínas en los extractos de las raíces transformadas con el T-DNA del vector pCAMhGHE (BRGHE#) en comparación con raíces no transformadas (RNT). MPM marcador de peso molecular. Los rectángulos blancos muestran los pesos moleculares estimados donde se encuentran las proteínas heterólogas, higromicin-fosfotransfereasa, β-glucuronidasa y hGH1.**

## 8.2. Purificación de la hGH1

### 8.2.1. Fraccionamiento de extractos de PTS

Para la purificación de la proteína hGH1 a partir de la PTS de los cultivos de raíces transformadas, los extractos crudos se fraccionaron con sulfato de amonio y filtración tangencial para obtener muestras menos complejas y facilitar los procedimientos siguientes de purificación.

Para el fraccionamiento con sulfato de amonio, se usaron 3 niveles de saturación: 30%, 60% y 90% (Fig. 11). Dado que la hGH1 es una proteína relativamente pequeña (22 kDa)

se esperaba que fuera encontrada en los sobrenadantes, al menos en aquellos con moderados niveles de saturación (menor a 80%). Por esta razón para su análisis fue necesario dializarlos para disminuir la concentración de sulfato de amonio que genera condiciones desfavorables para la separación por SDS-PAGE.

Como puede observarse las proteínas en las fracciones obtenidas de los sobrenadantes tratados con más del 60% de saturación fueron menores a 120 kDa. Claramente, la concentración de proteínas fue en decremento entre más se elevó la concentración de sulfato de amonio debido al aumento del volumen de buffer resultante de la diálisis. Por esa razón los sobrenadantes fueron después concentrados por centrifugación en “speed-vac”, pero se puede observar que cuanto más se tiende al 100% de saturación con sulfato de amonio, menos proteínas quedan en el sobrenadante. Sin embargo, debido a los bajos contenidos de proteína obtenida y la

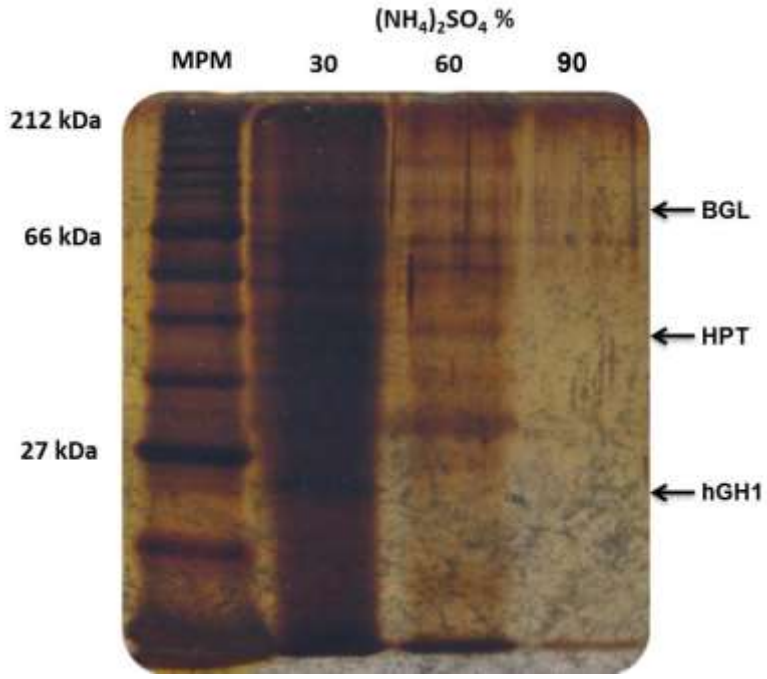


**Figura 11. Perfil de proteínas de los sobrenadantes de fracciones obtenidas por precipitación. Con 30, 60 y 90% de saturación con sulfato de amonio. MPM marcador de peso molecular.**

cantidad de los sobrenadantes resultó poco factible adoptar esta estrategia como primer paso de purificación que permitiera obtener suficiente muestra para los experimentos de caracterización estructural parcial de la proteína heteróloga, por lo que se investigó la estrategia de fraccionar los extractos crudos utilizando filtración tangencial. La PTS de cultivos en matraz de varias líneas de raíces transformadas fue extraída y fraccionada con tubos AMICON para filtración tangencial con membranas de corte de peso molecular de 100 kDa, 50 kDa y 3 kDa secuencialmente (Fig. 12). En el gel se cargaron las fracciones menores a 50 kDa (retenido) y menores a 3 kDa (diafiltrado). Como puede observarse, las fracciones obtenidas por este medio estuvieron por debajo de los 90 kDa, eliminando las proteínas de alto peso molecular, situación que favoreció los pasos siguientes de purificación de la hGH1. Además se observó en el gel un enriquecimiento de la fracción de proteínas de bajo peso molecular (-50kDa) mayor a los ensayos con sulfato de amonio alrededor del peso molecular de la proteína hGH1 (22 kDa).

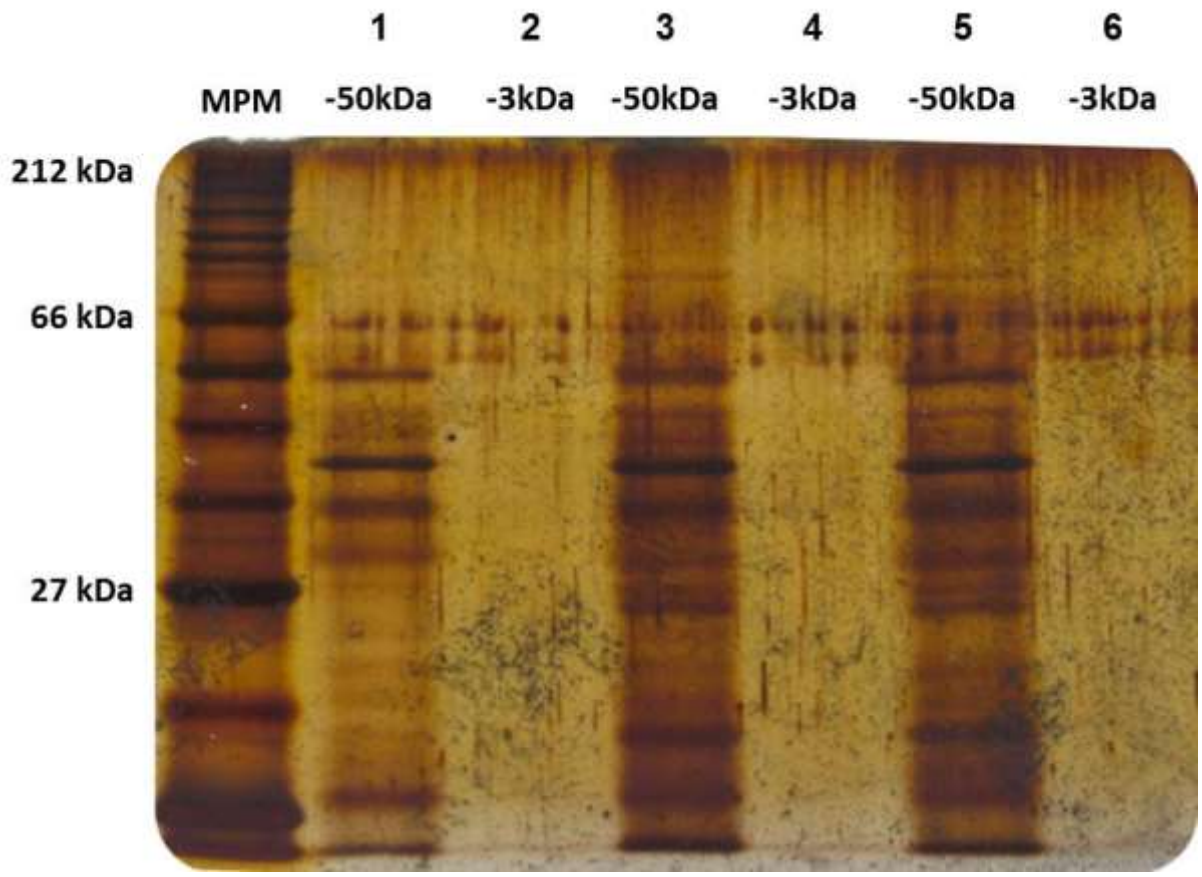


**Figura 12. Fracciones de 3-50 kDa (-50 kDa) y menores a 3 kDa (-3kDa) obtenidas por filtración tangencial a partir de PTS de las líneas BRGHE18 (carril 2 y 3), BRGHE17 (carril 3 y 4) y BRGHE22 (carril 5 y 6). MPM marcador de peso molecular.**

### 8.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico

De una extracción de aproximadamente 30 g de biomasa fresca de la línea élite BRGHE18, se obtuvo la fracción proteica de 3-50 kDa con concentración aproximada de 6 mg/ml. Esta fracción desalada fue aplicada a una columna de intercambio aniónico HiPrep 16/10 Q FF (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) instalada en un equipo FPLC ÄKTA (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) para resolver la muestra en comparación a hGH comercial usada como referencia (Fig.13). La muestra de la hGH1 comercial eluyó a un tiempo de retención de 19.33 min (Fig. 13A).

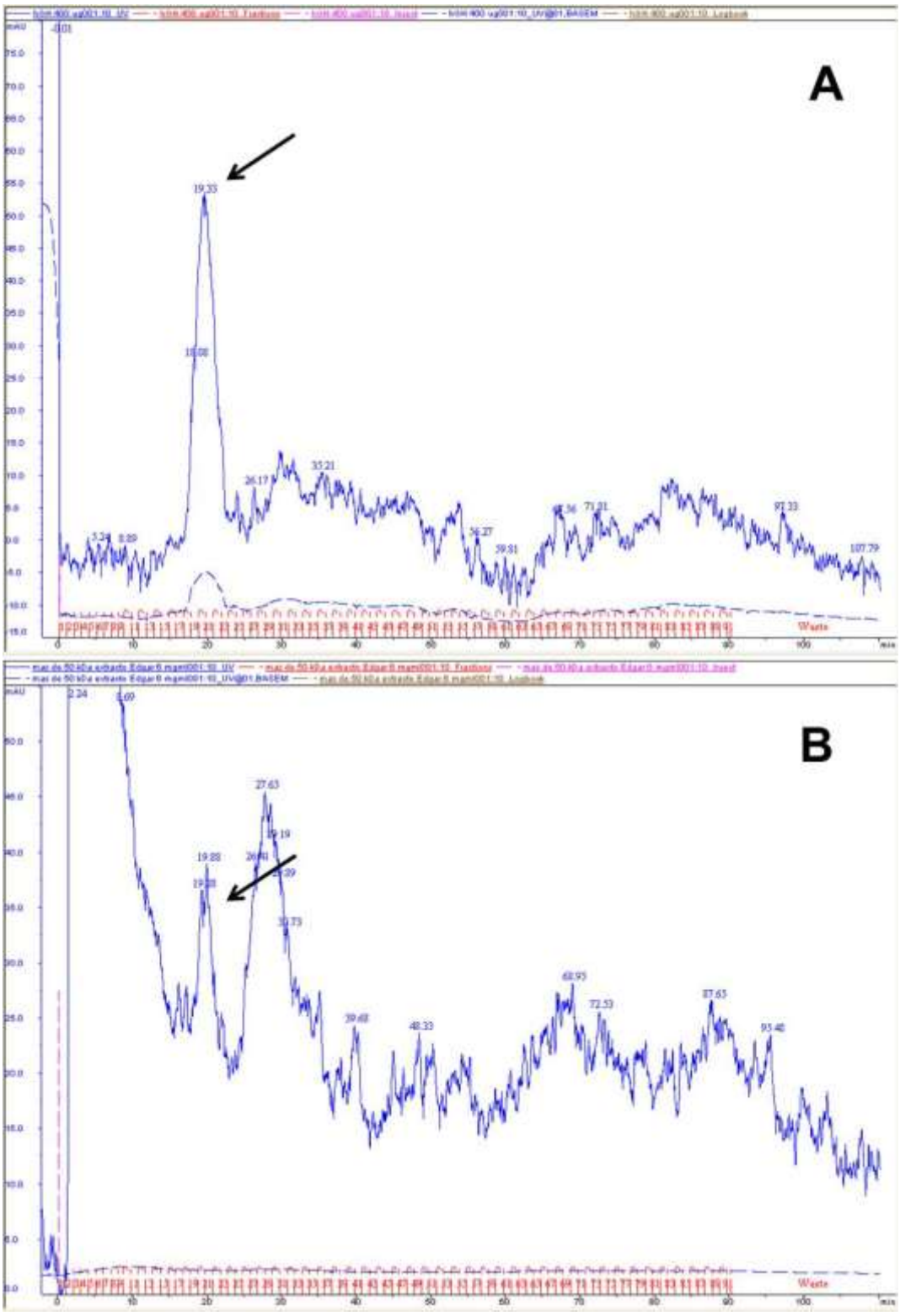


**Figura 13. Separación por cromatografía de intercambio iónico FPLC. A) hGH1 comercial (2 mg, Pfizer) y B) Fracción 3-50 kDa (6 mg/ml). Columna HiPrep 16/10 Q FF, analizador ÄKTAdesign controlado por UNICORN.**

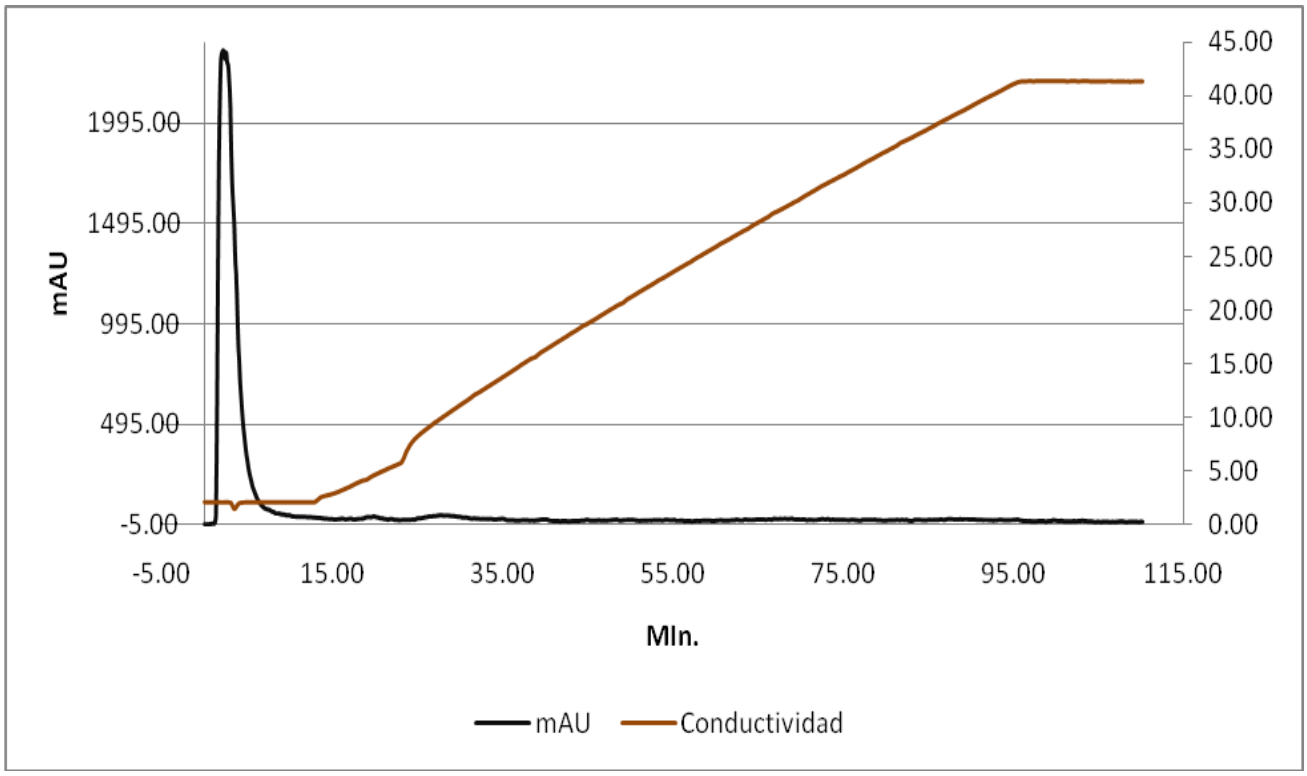


**Figura 14. Cromatograma completo del gradiente para el análisis de intercambio iónico de la fracción menor a 50 kDa (6 mg/ml). La conductividad indica el gradiente, nótese el pico predominante de proteína eluída en los primeros minutos correspondientes al lavado de la muestra no unida Columna HiPrep 16/10 Q FF, analizador ÄKTAdesign controlado por UNICORN.**

En la figura 13B se observa el perfil cromatográfico de la muestra, proveniente del pretratamiento por fraccionamiento mediante filtración tangencial, con gran cantidad de picos distribuidos a través de todo el gradiente de elución, sin embargo se observan claramente presencia de señales al tiempo esperado para la elución de la hGH1 (19 min). Cabe destacar que los datos en este cromatograma indican que probablemente más del 95% de la muestra inicial no fue retenida por interacción con el soporte de la columna, lo cual puede observarse en los primeros minutos de la corrida correspondientes al lavado (Fig. 14). No obstante, de este paso de purificación cromatográfica se pudo obtener una fracción enriquecida en hGH1 para ser separada posteriormente por peso molecular.

### 8.2.3. Cromatografía de exclusión molecular

Las fracciones cercanas al tiempo de retención de la hGH1 en la cromatografía de intercambio iónico fueron colectadas, liofilizadas y desaladas. La mezcla resultante se cargó en una columna de exclusión molecular Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) para su separación por peso molecular (Fig. 15). Se puede observar en la figura 15A el pico correspondiente a hGH comercial a los 24.73 min presente también en la fracción purificada anteriormente (Fig. 15B). En esta última separación también se observan gran variedad de picos correspondientes a pesos moleculares desde 70 kDa hasta 10 kDa. De entre estos picos se encontró un pico predominante con un tiempo de retención (24.77 min) muy similar al del estándar de la hGH1 (Fig. 15B). Las fracciones cercanas a este tiempo de retención se colectaron y se analizaron por ELISA contra hGH1 para cuantificar la proteína heteróloga purificada.

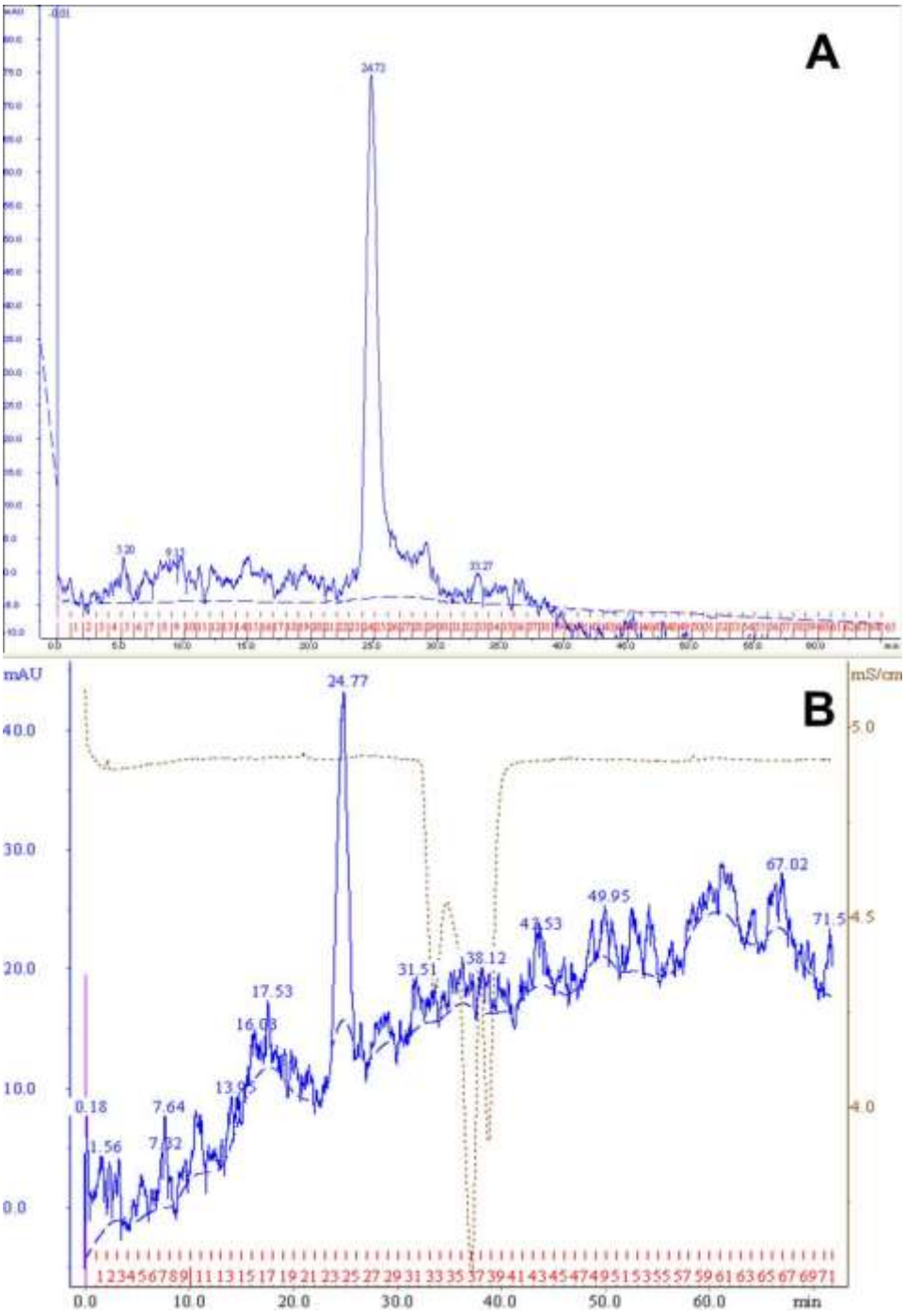


**Figura 15. Análisis por cromatografía de exclusión molecular de A) hGH comercial (0.2 mg) (Pfizer) y B) fracciones colectadas de la cromatografía de intercambio iónico concentradas hasta 250 µl (aprox. 0.5 mg/ml). Columna Superdex 75 10/300 GL, analizador ÄKTAdesign controlado por UNICORN.**

Para obtener la distribución de la hGH1 en la PTS y en la fracción purificada por intercambio iónico y exclusión molecular, se realizó el ensayo de ELISA en el extracto crudo de PTS del que se partió para la purificación y en la purificada. Se encontró que la

cantidad de la hGH1 en el extracto fue de aproximadamente de 0.72 µg/ml (65 µg en el total de la muestra), que contrastado con la cantidad en la fracción purificada (43 µg/ml) da 60 % de recuperación de la proteína hGH1 contenida en la muestra de PTS extraída a partir de 30 g de biomasa. Esta fracción obtenida a partir de la purificación (Fig. 15B) fue concentrada por filtración tangencial a un volumen de 50 µl, desalada y se realizó un intercambio de buffer a fosfatos 20 mM, pH 7. Tras el tratamiento, esta muestra presentó una concentración de 0.9 mg hGH1/ml. Los resultados de la determinación específica de la hGH1 por ELISA revelaron que el 90% de la proteína en esta muestra concentrada era hGH1.

### 8.3. Modificación de las condiciones de cultivo en matraz y biorreactor

#### 8.3.1. Efecto de la concentración y tipo de fuente de carbono y nitrógeno en la acumulación de biomasa y proteína

Para el establecimiento de condiciones básicas de producción se diseñó un experimento factorial (3*3*3) en el cual se evaluó el efecto de la concentración de $KNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$ y de sacarosa en el medio de cultivo sobre la acumulación de biomasa y proteína total soluble (Tabla 4). Los niveles fueron establecidos alrededor de los valores basales de la formulación reportada para el medio SH (Schenk y Hildebrandt 1972), el cual previamente se había determinado que soportaba el crecimiento de los cultivos de raíces transformadas de brócoli que el medio B5 y MS (García-López 2009).

**Tabla 4. Tratamientos para evaluar el efecto de la concentración de las fuentes de nitrógeno y carbono en la acumulación de proteína y biomasa de raíces transformadas**

| | | $(NH_4)_2SO_4$ | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.75 mM | | | 1.5 mM | | | 2.3 mM | | |
| | | Sacarosa | | | | | | | | |
| | | 29 mM | 58 mM | 87 mM | 29 mM | 58 mM | 87 mM | 29 mM | 58 mM | 87 mM |
| $KNO_3$ | 25 mM | 1 | 2 | 3 | 10 | 11 | 12 | 19 | 20 | 21 |
| | 15 mM | 4 | 5 | 6 | 13 | 14 | 15 | 22 | 23 | 24 |
| | 10 mM | 7 | 8 | 9 | 16 | 17 | 18 | 25 | 26 | 27 |

**Los números indican el número de tratamiento. *Mejores condiciones para producción de biomasa y PTS (Ver figuras 16 y 17).**

La acumulación de biomasa después de 20 días alcanzó mayores cantidades cuando se combinaron los más altos niveles de los tres componentes (Fig. 16). Por ejemplo, la acumulación de biomasa en los mejores tratamientos fue de 19.5 g PS/L en el tratamiento 12 y 23.2 g PS/L en el tratamiento 21 después de 15 días de crecimiento.

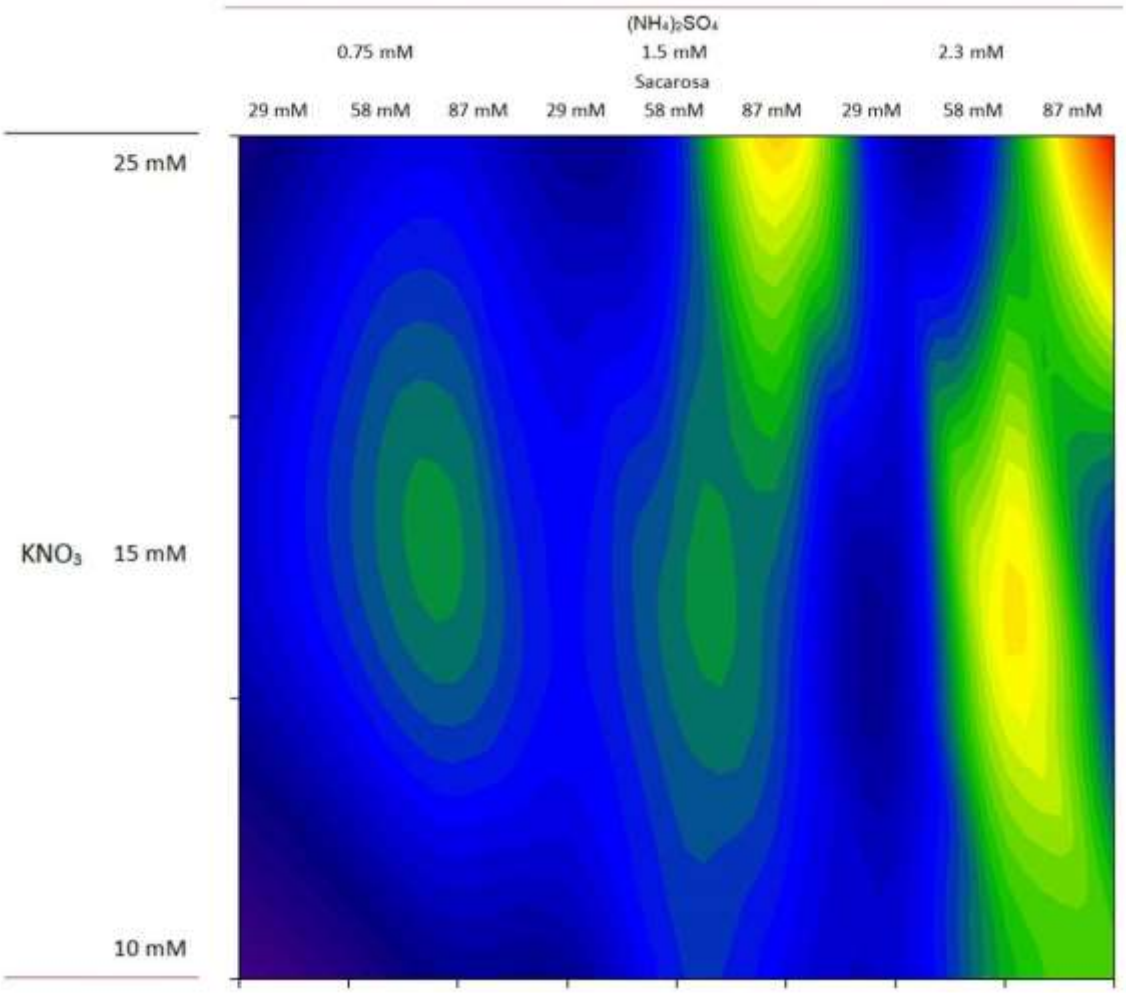


**Figura 16. Gráfica de contorno de acumulación de biomasa en los cultivos de raíces transformadas. La escala cromática indica en los colores amarillo y rojo los tratamientos con mayor acumulación de biomasa.**

Una tendencia similar se observó para la acumulación de proteína total soluble (Fig. 17), encontrando mayor producción en los tratamientos con los más altos niveles de sacarosa y nitrógeno. Los mayores valores fueron de hasta 40 $mg_{prot}$/cultivo en el tratamiento 21, correspondiente a 30g/L de sacarosa, 2.5 g/l de $KNO_3$/L y 300mg/L de $(NH_4)_2SO_4$ (Figura 17A-C).

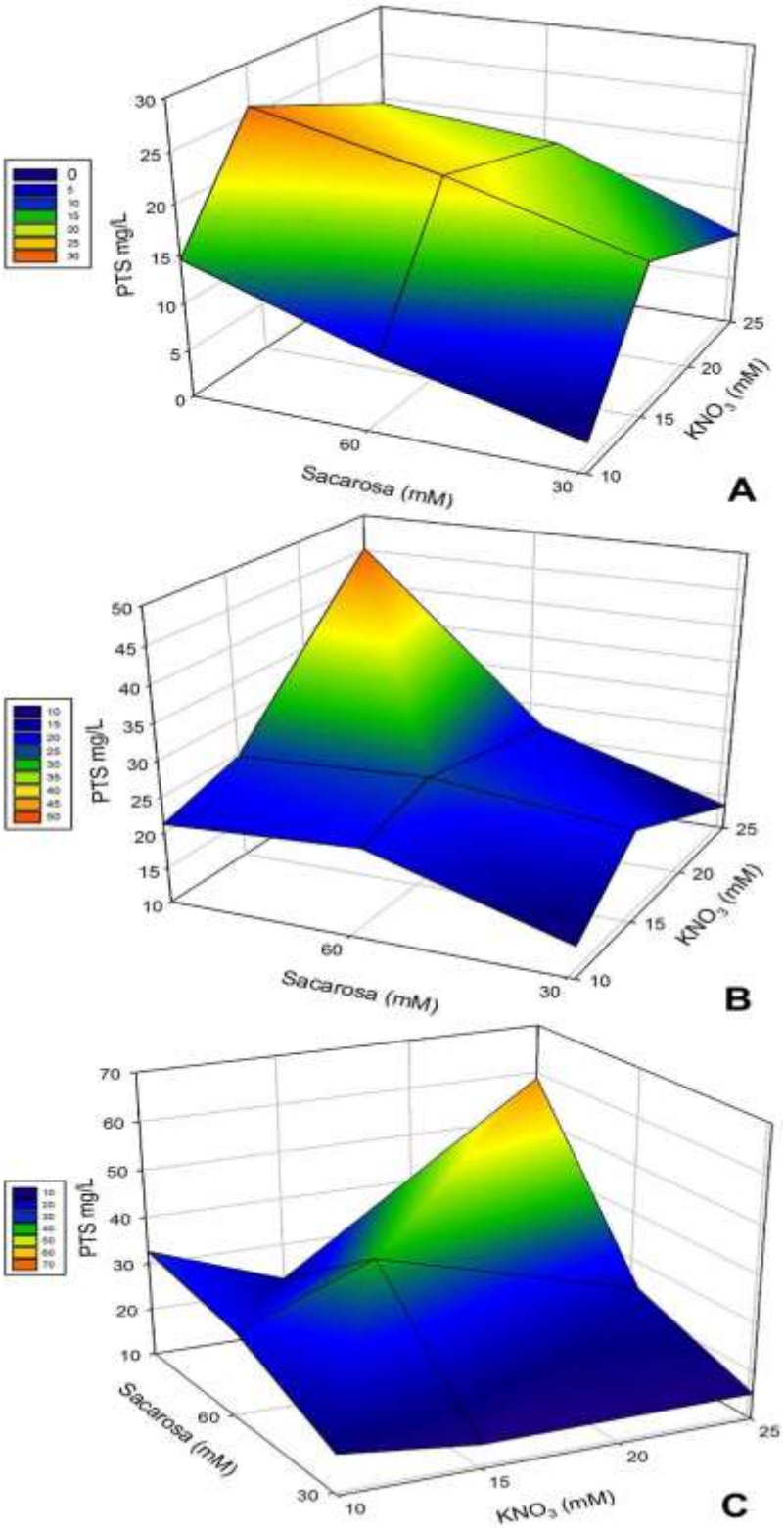


**Figura 17. Superficies de respuesta de acumulación de PTS (mg/L). Para $(NH_4)_2SO_4$ A) 0.75 mM, B) 1.5 mM y C) 2.3 mM. La escala cromática indica en los colores amarillo y rojo los tratamientos con mayor acumulación de PTS.**

Los análisis de varianza tanto para acumulación de biomasa como de PTS (Tabla 5) revelaron que los tres factores ($KNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$ y sacarosa) tuvieron efecto significativo (P < 5% de significancia). Sin embargo los efectos predominantes fueron los ejercidos por la sacarosa y $(NH_4)_2SO_4$. Además, para el caso de la biomasa la interacción $KNO_3$*Sacarosa y la triple interacción tuvieron efectos significativos, mientras que en la acumulación de proteína la doble interacción $KNO_3$*Sacarosa fue la única significativa. Estos resultados mostraron que existe una relación entre el consumo de las fuentes de nitrógeno y sacarosa que impacta en el crecimiento del tejido. Aunque se ha observado que el $NO_3^-$ es la fuente de nitrógeno más importante para el desarrollo de las raíces (Bloom 2010), la mayoría de las plantas y sus raíces crecen mejor si tienen acceso a $NO_3^-$ y $NH_4^+$, debido a que la asimilación de las 2 formas promueve un balance anión – catión dentro de la célula (Bloom 2010), además de que suplementar las dos especies de manera balanceada tiende a reducir el aumento de pH en el medio de cultivo observado cuando solo se adiciona la fuente de nitrógeno como el anión nitrato (Bloom 2010).

**Tabla 5. Análisis de varianza para evaluar el efecto de la sacarosa y nitrógeno sobre la producción de biomasa (gPF/L) y proteína total soluble por cultivos de raíces transformadas de brócoli**

| Biomasa (gPF/L) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Fuente de variación | GL | SC | MC | F | P |
| $KNO_3$ | 2 | 33.291 | 16.646 | 5.22* | 0.012 |
| Sacarosa | 2 | 121.918 | 60.959 | 19.11* | 0.000 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2 | 119.199 | 59.6 | 18.68* | 0.000 |
| $KNO_3$*Sacarosa | 4 | 86.762 | 21.69 | 6.8* | 0.001 |
| $KNO_3$*$(NH_4)_2SO_4$ | 4 | 31.966 | 7.992 | 2.51 | 0.066 |
| Sacarosa*$(NH_4)_2SO_4$ | 4 | 13.362 | 3.341 | 1.05 | 0.401 |
| $KNO_3$*Sacarosa*$(NH_4)_2SO_4$ | 8 | 73.563 | 9.195 | 2.88* | 0.019 |
| Error | 27 | 86.124 | 3.19 | | |
| Total | 53 | 566.184 | | | |

**Proteína total soluble**

| Fuente de variación | GL | SC | MC | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| KNO3 | 2 | 222.85 | 111.43 | 3.72* | 0.037 |
| Sacarosa | 2 | 971.41 | 485.7 | 16.21* | 0.000 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2 | 824.43 | 412.22 | 13.76* | 0.000 |
| $KNO_3$*Sacarosa | 4 | 508.85 | 127.21 | 4.25* | 0.009 |
| $KNO_3$*$(NH_4)_2SO_4$ | 4 | 170.13 | 42.53 | 1.42 | 0.254 |
| Sacarosa*$(NH_4)_2SO_4$ | 4 | 120.65 | 30.16 | 1.01 | 0.421 |
| $KNO_3$*Sacarosa*$(NH_4)_2SO_4$ | 8 | 400.56 | 50.07 | 1.67 | 0.152 |
| Error | 27 | 809.01 | 29.96 | | |
| Total | 53 | 4027.9 | | | |

***Efecto significativo a un α = 0.05**

Comparando las medias de los tratamientos mediante una prueba post-anova de Tukey (α 0.05), se encontró que los mejores tratamientos para la acumulación de proteína y biomasa fueron los 12 y 21 correspondientes a 87 mM de sacarosa, 25 mM de $KNO_3$, y 1.5 o 2.3 mM de $(NH_4)_2SO_4$ respectivamente.

Cabe mencionar que con las condiciones del tratamiento 21 con 2.3 mM de $(NH_4)_2SO_4$ se logró aumentar la acumulación de biomasa de la línea BRHGE18 aproximadamente 3.5 veces comparado a los valores obtenidos en medio sin modificar. También se aumentó con estas condiciones el contenido de proteína aproximadamente 2.3 veces comparado al obtenido en medio sin modificar. Complementariamente, se determinó el contenido de la hGH1 en las muestras de algunos de los tratamientos seleccionados con base en sus niveles de acumulación de PTS y biomasa (Tabla 6). Se encontró que en general la producción de proteína hGH1 fue similar a la observada en el tratamiento control. Sin embargo fue mayor para los tratamientos 12 y 21 donde se encontró también mayor producción de biomasa y PTS. Estos resultados concuerdan con lo visto en el análisis para la acumulación de proteína total soluble, debido a que su aumento, afecta de igual manera la síntesis en general de proteínas incluyendo a la hGH1 heteróloga. Así, una vez

que los contenidos de la hGH1 son relacionados con los valores de acumulación de biomasa, es claro que los tratamientos con mayor tasa de crecimiento presentan las mejores productividades específicas de la hGH1 (Tabla 6).

**Tabla 6. Contenido específico de la hGH1 en tratamientos seleccionados del experimento de modificación de medio de cultivo. Tratamiento control (TC) raíces creciendo en medio de cultivo SH sin modificar**

| Tratamiento | µg hGH1/gPS | Tratamiento | µg hGH1/gPS |
|---|---|---|---|
| TC | 8.66 | T14 | 10.25 |
| T3 | 11.47 | T21* | 9.30 |
| T5 | 5.58 | T23 | 5.68 |
| T12* | 10.10 | T27 | 8.07 |

***Mejores tratamientos después del análisis de comparación de medias.**

Ya se ha reportado que las raíces transformadas de diversas especies se comportan de diferente manera bajo las mismas condiciones de cultivo (Sevon y Oksman-Caldentey 2002). Además, clonas de raíces individuales pueden requerir diferentes valores óptimos de sacarosa, nitrógeno y minerales; para generar niveles deseables de los compuestos de interés (Sevon y Oksman-Caldentey 2002). Por tanto, estos requerimientos específicos para cada cultivo hacen de la optimización de medios de cultivo un trabajo difícil, ya que las condiciones deben de ser optimizadas individualmente para cada especie y sus clonas.

### 8.3.2. Efecto de modificaciones estructurales de un biorreactor *airlift* sobre la acumulación de biomasa y proteína total soluble

Se evaluó el efecto de modificaciones estructurales a un biorreactor tipo *airlift* sobre la acumulación de biomasa y proteína total soluble. Las modificaciones fueron la adición de una malla de acero inoxidable de 1 cm de apertura y la incorporación de un tubo concéntrico de arrastre en diferentes configuraciones. Cuatro configuraciones

estructurales fueron probadas, el biorreactor sin modificaciones, con sólo la malla, con sólo el tubo de arrastre y con tubo concéntrico y malla. Adicionalmente se inoculó un matraz Fernbach de 1.5 L con el mismo volumen de medio de cultivo e inóculo que el biorreactor para comparar ambos sistemas.

Las primeras corridas correspondieron a cultivos en el biorreactor sin las modificaciones estructurales. En estos se observó que la biomasa no pudo distribuirse uniformemente manteniéndose en la superficie del medio de cultivo. La biomasa generada fue de 18.6 g/L con un consumo final de sacarosa del 40% aproximadamente (Tabla 7). La concentración de PTS fue de 0.65 mg/mL. En el biorreactor con solamente el tubo de arrastre distribución de biomasa tuvo los mismos problemas de homogenización que el ensayo anterior (Fig. 18A). La biomasa acumulada fue de 12.2 g/L y el consumo final de sacarosa del 45%. La concentración de PTS fue de 0.87 mg/mL de extracto, es decir, 2.61 mg/gPF.

El cultivo en el biorreactor con la malla de acero pero sin el tubo de arrastre, mostró una mejor distribución de la biomasa, ya que el tejido se ancló en zonas de la malla y formó agregados en el seno del medio de cultivo y no sólo en la superficie del medio de cultivo (Fig. 18B). Este efecto incrementó la acumulación de biomasa hasta 32.4 g/L y la PTS hasta 0.95 mg/mL. Los cultivos bajo estas condiciones consumieron el 65% de sacarosa (Tabla 7).

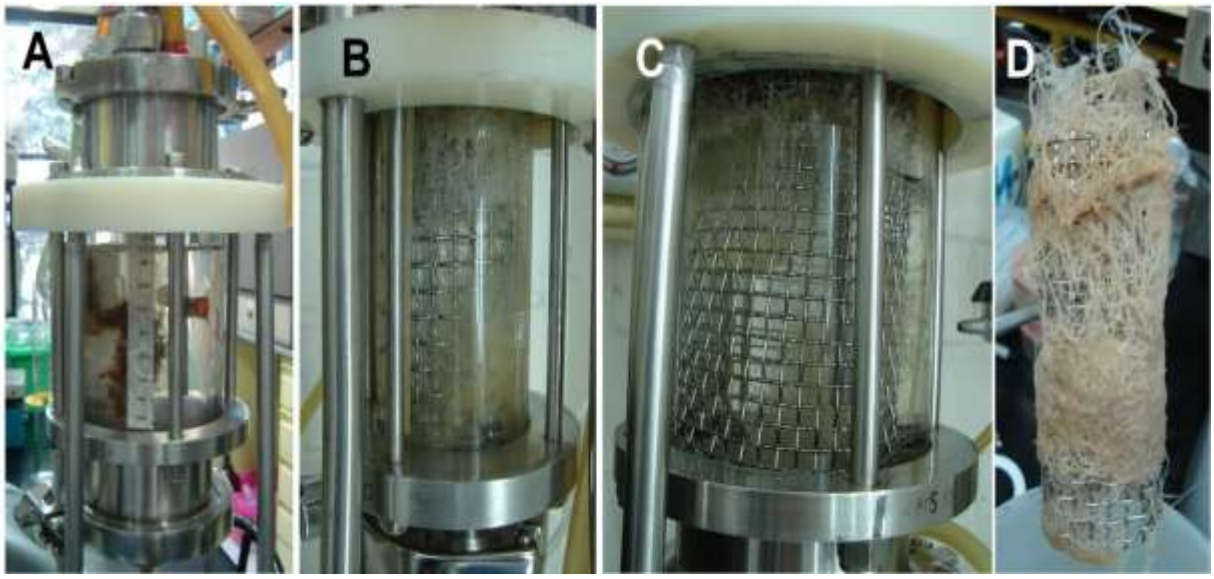


**Figura 18. Cultivos de raíces transformadas después de 24 días de cultivo en el biorreactor *airlift* de 1.5 L con tubo concéntrico de arrastre (A), después de 7 días en el biorreactor con malla metálica (B) y después de 7 días en el reactor con malla y tubo concéntrico de arrastre (C). (D) Cosecha del cultivo de raíces transformadas después de 24 días de cultivo, nótese la distribución de las raíces sobre la malla metálica. El medio de cultivo fue SH suplementado con sacarosa (30 g/L). Flujo de aire 0.2 vvm.**

En los cultivos en el biorreactor con la malla de acero y tubo concéntrico de arrastre, después de 24 días el crecimiento acumuló 45.88 g/L de biomasa; distribuida prácticamente sobre la totalidad de la superficie de la malla (Fig. 18C y 18D). Este efecto en la distribución de biomasa se debió al mejor mezclado del medio de cultivo ejercido por el tubo concéntrico durante los primeros días de crecimiento. Es decir, en el periodo cuando las raíces se encontraban disgregadas finamente; lo que permitió que se pudieran dispersar y anclar en más lugares de la malla. En este cultivo la acumulación de PTS llegó hasta 1.23 mg/mL (3.7 mg/gPF) y el consumo de sacarosa llegó al 80%. Por otro lado, el cultivo en matraz Fernbach generó mayor biomasa (57.3 g/L) que el biorreactor (Tabla 7), sin embargo la producción volumétrica y específica de PTS fue menor que en el biorreactor con malla y tubo de arrastre. No obstante, la biomasa en matraz exhibió oxidación severa después de 10 días de cultivo y no formó agregados, que según lo observado favorecen el crecimiento de tejido radicular. La producción de la

hGH1 para las diferentes condiciones de cultivo se resume en la tabla 7. Puede observarse que los contenidos de la hGH1 correlacionan directamente con la cantidad de proteína total soluble generada por cada cultivo, lo que resulta consistente considerando que la expresión de la hGH1 está controlada por un promotor fuerte y constitutivo, como lo es el promotor 35S. Así, entre más cantidad de PTS, mayor contenido de la hGH1, lo que indica que la productividad específica de la hGH1 no está directamente influenciada por las modificaciones estructurales pero si por la cantidad de biomasa generada y, por ende el contenido de PTS.

En resumen, puede observarse que los cultivos crecen mejor cuando tienen lugares dónde anclarse, por tanto aumentaron los valores de acumulación de biomasa cuando se agregó la malla metálica y el tubo de arrastre, sin embargo, el tubo de arrastre tuvo un papel importante no sólo en el mezclado y en favorecer mejor distribución de las raíces mientras estaban disgregadas sino que también formó más lugares de anclaje cuando se puso dentro de la malla. Fue en estos lugares de contacto entre la malla con el tubo concéntrico que se generaron agregados importantes de raíces.

**Tabla 7. Efecto de la modificación estructural del biorreactor sobre la acumulación de biomasa, proteína total soluble y contenido de la hGH1**

| | Biorreactor | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Sin modificaciones** | **Con tubo concéntrico** | **Con malla metálica** | **Con tubo y malla** | **Matraz Fernbach** |
| **Volumen nominal L** | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 2.5 |
| **Acumulación de Biomasa g/L** | 18.6 | 12.2 | 32.4 | 45.88 | 57.3 |
| **Acumulación de PTS mg/mL** | 0.65±0.09 | 0.87±0.13 | 0.95±0.1 | 1.23±0.11 | 0.84±0.07 |
| **Acumulación de PTS mg/gPF** | 1.95±0.27 | 2.61±0.21 | 2.85±0.3 | 3.69±0.33 | 2.52±0.21 |
| **Contenido de la hGH1 µg/gPS** | 5.3±0.36 | 4.7±0.42 | 8±0.23 | 7.8±0.3 | 5.1±0.42 |
| **Consumo de sacarosa %** | 37±2.5 | 45±2.2 | 63±3.4 | 80±1.3 | 85±2.6 |

## 8.4. Caracterización de la proteína hGH1 heteróloga

### 8.4.1. Análisis de western blot

Con la finalidad de corroborar la presencia, identidad e integridad de la proteína hGH1 expresada heterólogamente por los cultivos de raíces, las muestras purificadas y fracciones a partir de los extractos fueron primeramente analizadas por western blot (Fig. 19). Después de titular los anticuerpos y determinar la cantidad mínima detectada de la hGH1, se evaluó la presencia de la hGH1 (22 kDa) en las muestras purificadas y concentradas a partir de un cultivo de la línea 18 en biorreactor con malla y tubo concéntrico (Carriles 3 y 4 de la figura 19). En la membrana se observaron claramente las señales correspondientes al PM de la hGH1, tanto de las muestras purificadas como de la hGH comercial usada como referencia, como para la fracción de PTS de 3-50 kDa. Debe hacerse notar que la hGH1 no pudo ser detectada en el extracto crudo de la PTS seguramente debido a que la cantidad presente en esta muestra no fue suficiente para llegar a los límites de detección de la técnica. También es importante señalar que cuando la membrana se sometió a tiempos de exposición prolongados para el revelado, como 10 minutos (Fig. 19B), se pudieron observar señales de aproximadamente 14 kDa. Observaciones similares de fragmentos.

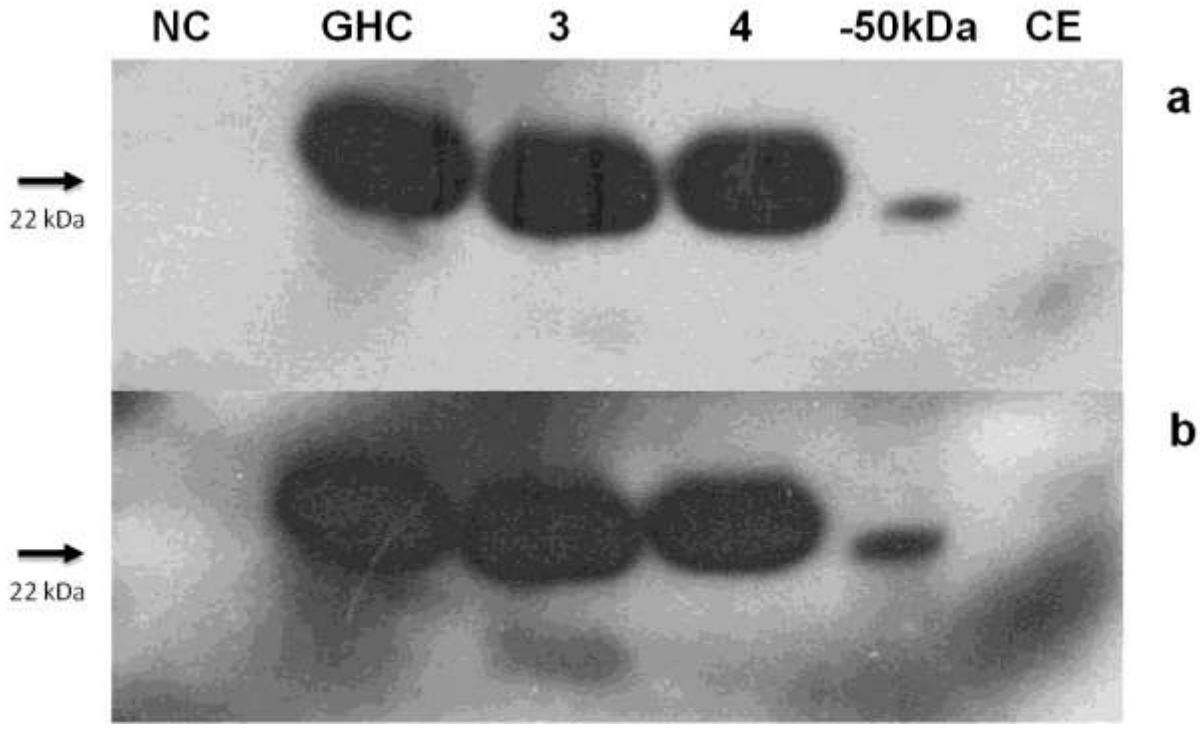


**Figura 19. Análisis de la hGH1 por western blot. a) 4 minutos de exposición, b) 10 minutos de exposición. Carril NC: extracto de proteína total soluble de raíces no transformadas (control negativo). Carril GHC, hGH1 comercial (Pfizer NY, NY, USA). Carriles 3 y 4, muestras purificadas de extractos proteicos de raíces transformadas. Carril -50kDa, fracción de menos de 50 kDa obtenida por filtración tangencial. Carril CE, extracto crudo de proteína de línea transformada. Los carriles GHC, 3 y 4 se cargaron con 0.5 µg de la proteína hGH1; el carril -50 kDa contenía 40 ng de la hGH1.**

Patrones similares de fragmentación han sido reportados en la expresión de proteínas heterólogas en sistemas vegetales como plantas transgénicas de soya, células en suspensión de tabaco, semillas de maíz (Russell *et al*. 2005; Staub *et al*. 2000) y en cultivos de células en suspensión de arroz (Kim *et al*. 2008). Estos fragmentos pueden ser generados durante el procedimiento de purificación o por la actividad proteolítica *in planta* (Russell *et al*. 2005). Estas situaciones han sido ya abordadas y reconocidas como factores importantes que afectan la estabilidad de las proteínas y su expresión en sistemas vegetales. Aun cuando en este sistema de raíces transformadas no se ha encontrado actividad proteolítica significativa, como se mencionó anteriormente, el rendimiento total de la hGH1 podría ser mejorado implementando estrategias para

prevenir la degradación como la co-expresión con inhibidores de proteasas (Kim *et al*. 2007; Xu *et al*. 2004) o la adición directa de inhibidores de proteasas al medio de cultivo (Russell *et al*. 2005).

### 8.4.2. Análisis estructural por huella peptídica de la hGH1 por espectrometría de masas MALDI-TOF

Una vez comprobada la presencia de la proteína hGH1 heteróloga en los extractos de PTS por reconocimiento específico vía western blot se caracterizó la estructura primaria por identificación de los péptidos generados por digestión tríptica por huella peptídica por espectrometría de masas MALDI-TOF. La fracción purificada y concentrada anteriormente fue cargada (3 µg) y resuelta en geles de acrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes y revelados con nitrato del plata y azul de Coomassie (Fig. 20). En ellos se observó una banda del tamaño molecular aproximado de la hGH1 (22 kDa). Las bandas de las muestras purificadas mostraron un perfil electroforético similar al mostrado por la hGH1 comercial. Dado que la tinción de plata es más sensible que la tinción con azul de Coomassie, las bandas en el gel teñido con plata se observan más intensamente. No obstante el protocolo para desteñir los geles revelados con plata para luego ser analizados por MALDI-TOF tiene puede dejar componentes interferentes con la ionización de los péptidos; por esa razón se utilizaron preferentemente geles teñidos con azul de Coomassie.

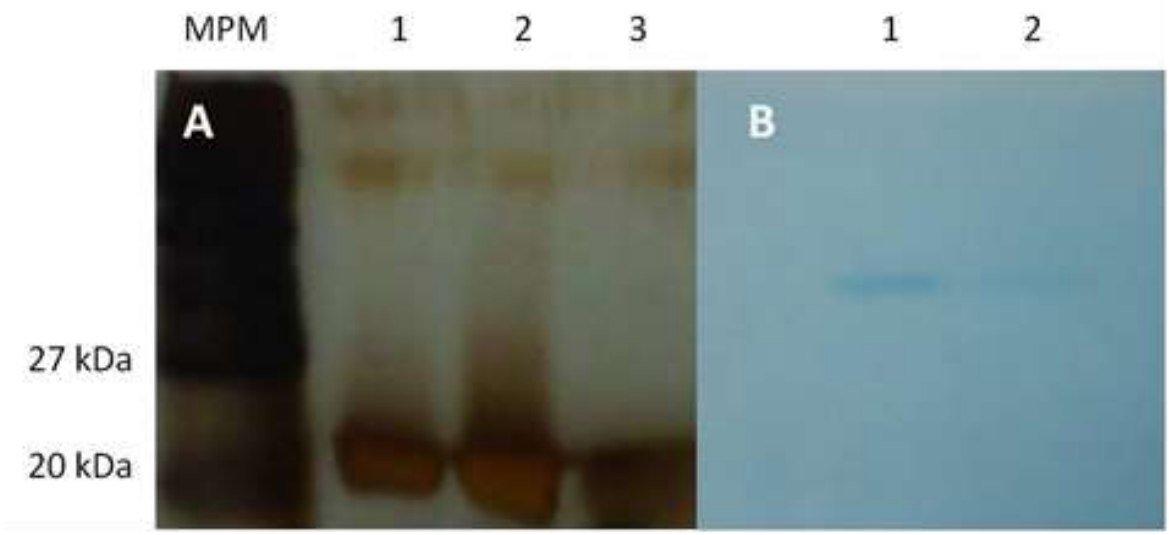


**Figura 20. A Gel teñido con nitrato de plata, carril 1 hGH comercial, 2 y 3 fracción colectada y concentrada. B Gel teñido con Coomassie, carril 1 hGH comercial, 2 fracción colectada y concentrada.**

A partir de estos geles se cortaron los fragmentos que contenían las bandas, correspondientes a las muestras purificadas y a la hGH1 comercial. Las bandas se digirieron *en gel* con tripsina y se extrajeron los péptidos resultantes para su análisis por huella peptídica MS-MALDI-TOF para su identificación y caracterización. Los espectros de masas de la muestra de la proteína heteróloga (Figura 21B) mostraron señales recurrentes similares a las encontradas en el espectro de masas correspondientes a la hGH1 comercial (Fig. 21A). El análisis de masas de estas señales se realizó utilizando el software ProteinPilot, identificando ambas muestras analizadas como somatotropina (Tabla 8). La totalidad de los péptidos analizados corresponden al 28.79% de la secuencia de aminoácidos reportada en la base de datos del SwissProt (Tabla 8). Resultante de este análisis, 6 péptidos detectados en el espectro de masas de la muestra de la hGH1 expresada heterólogamente (indicados con flechas en la figura 21B) y 5 péptidos de la hGH1 comercial (21A) fueron identificados sin ambigüedad por el algoritmo

del Software ProteinPilot como parte de la estructura primaria de la somatotropina, o también llamada hormona de crecimiento humano.

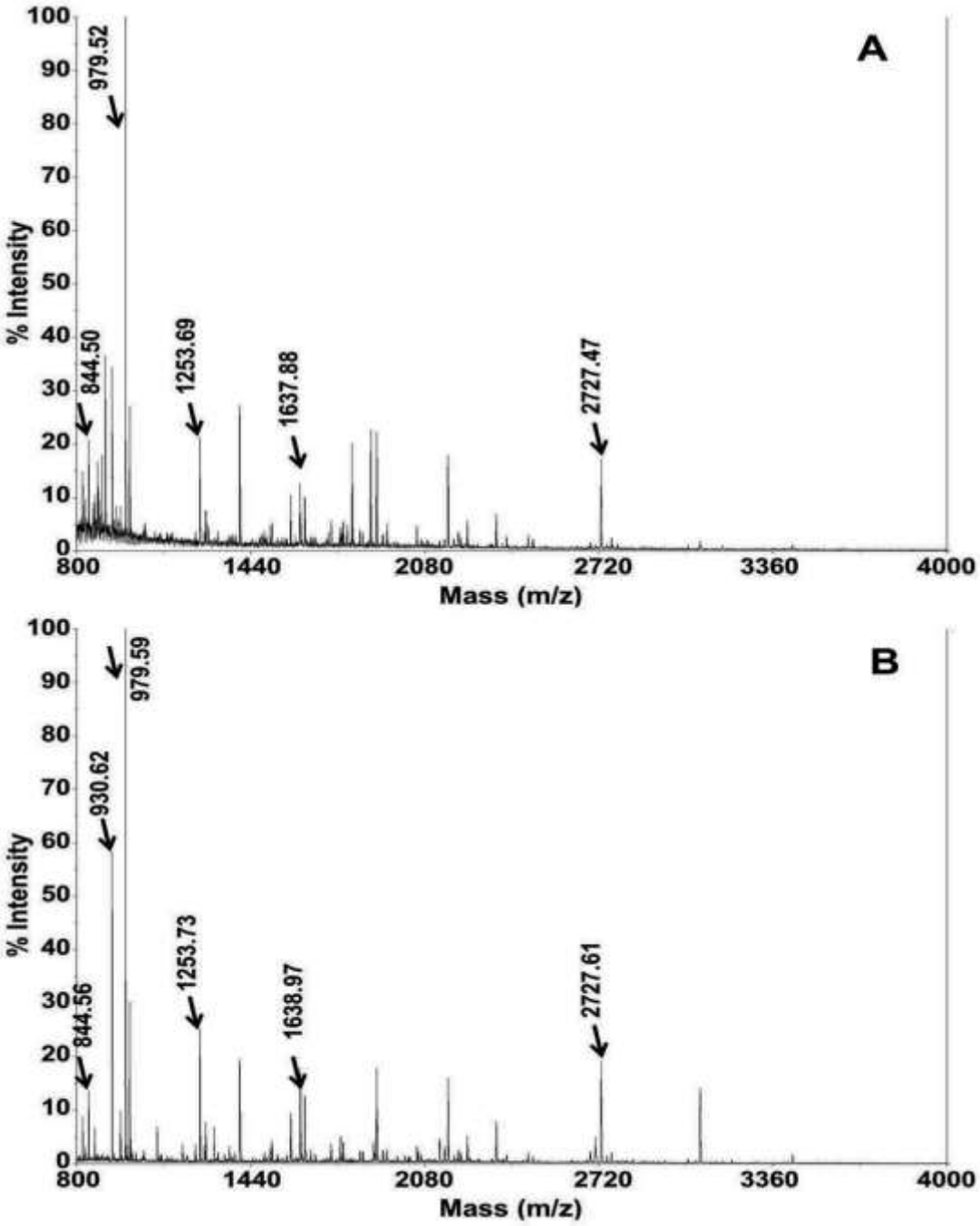


**Figura 21. Espectros de masas de los péptidos producidos por digestión tríptica de: A) hGH1 estándar y B) hGH1 expresada heterólogamente en cultivos de raíces cultivadas en biorreactor y cosechadas después de 24 días. Se usó un analizador 4800 plus MALDI-TOF (Applied BIosystems). Las flechas indican los péptidos identificados sin ambigüedad resumidos en la tabla 8.**

**Tabla 8. Resumen de los péptidos identificados por el análisis de huella peptídica para identificación y caracterización de la hGH1 heteróloga**

Secuencia de aminoácidos de la somatotropina, en negritas se muestran los péptidos identificados. La cobertura de la secuencia fue 28.79%
1: **FPTIPLSRLF DNAMLR**AHR**L HQLAFDTYQE FEEAYIPKEQ K**YSFLQNPQT SLCFSESIPT PSNREETQQK
71: **SNLELLR**ISL LLIQSWLEPV QFLRSVFANS LVYGASDSNV YDLLKDLEEG IQTLMGRLED GSPRTGQIFK
141: QTYSKFDTNS HNDDALLKNY GLLYCFRK**DM DKVETFLR**IV QCRSVEGSCG F

| Muestra Digerida | Proteína identificada (ProteinPilot) | Inicio-final en la secuencia | Secuencia del péptido identificado | Masa predicha $MH^+$ (m/z) | Masa calculada $MH^+$ (m/z) |
|---|---|---|---|---|---|
| Estándar hGH1 | Somatotropina | 9-16 | LFDNAMLR | 979.52 | 979.24 |
| | | 20-41 | LHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQK | 2727.47 | 2727.86 |
| | | 28-41 | QEFEEAYIPKEQK | 1637.88 | 1637.16 |
| | | 71-77 | SNLELLR | 844.50 | 844.94 |
| | | 169-179 | DMDKVETFLR | 1253.69 | 1253.08 |
| hGH1 Heteróloga | Somatotropina | 1-8 | FPTIPLSR | 930.62 | 930.28 |
| | | 9-16 | LFDNAMLR | 979.59 | 979.61 |
| | | 20-41 | LHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQK | 2727.61 | 2727.86 |
| | | 28-41 | QEFEEAYIPKEQK | 1638.97 | 1639.12 |
| | | 71-77 | SNLELLR | 844.56 | 844.36 |
| | | 169-179 | DMDKVETFLR | 1253.73 | 1253.41 |

Interesantemente, más allá del análisis de los péptidos identificados sin ambigüedad (Tabla 8), se encontraron señales en los espectros de masas de la hGH1 heteróloga a 930.62 m/z y 979.59 m/z que en combinación conforman la secuencia FPTIPLSRLFDNAMLR, misma que es idéntica a la secuencia del péptido amino terminal de la forma madura de la hGH1 nativa. Adicionalmente, el péptido detectado a 1400.7 m/z en el espectro de masas de ambas muestras analizadas indica la posición y formación de los enlaces disulfuro consistentes con la somatotropina humana (Staub *et al*. 2000). De esta manera, estos resultados soportan que los cultivos de raíces transformadas creciendo en el biorreactor modificado expresan y procesan la hGH1 correctamente a nivel de estructura primaria.

## 9. Discusión

Los resultados obtenidos en este proyecto demostraron que los cultivos de raíces transformadas de *Brassica oleracea* var. *italica* poseen el potencial para ser usados como un sistema de expresión heteróloga para la producción de proteínas humanas con actividad terapéutica, cultivadas en biorreactores modificados del tipo *airlift*. Bajo el primer escrutinio de los cultivos establecidos, se observó que aunque todos ellos exhibían el fenotipo característico de las raíces transformadas (Christey y Braun 2004) solamente 12 de los 25 cultivos establecidos inicialmente expresaron los genes de resistencia *hptII* y reportero *GUSPlus* contenidos en el T-DNA del vector binario pCAMhGHE (García-López 2009). Esta observación sugirió que de 13 líneas de raíces transformadas (52%) pudieron haber estado transformadas únicamente con el T-DNA del plásmido Ri1855, presente de manera silvestre en la cepa de *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402 y que se inserta al genoma de la planta de manera aleatoria y que es responsable del fenotipo anteriormente mencionado (Tzfira y Citovsky 2006). Alternativamente, la expresión de los genes heterólogos pudo haber sido insuficiente para mantener el crecimiento en presencia de higromicina o para asegurar una actividad de β-glucuronidasa observable. Este razonamiento pudiera explicar la variabilidad observada en la producción de la hGH1 heteróloga a nivel de matraz (Fig. 8), en donde algunas líneas de raíces crecieron sin problemas en medio de cultivo adicionado con higromicina y mostraron correctamente la expresión de β-glucuronidasa pero fueron incapaces de expresar cantidades significativas de la hGH1, por ejemplo de estos las líneas 4 y 12. Variabilidad como la encontrada en estos cultivos ha sido reportada ampliamente para la producción de anticuerpos por varias clonas de raíces transformadas de *Nicotiana tabacum* (Banerjee *et al*. 2002; Sharp y Doran 2001; Wongsamuth y Doran 1997) y, de hecho es un fenómeno

general observado entre clonas en la expresión de proteínas heterólogas en sistemas vegetales basados en la transformación por *Agrobacterium* (Xu *et al*. 2012), particularmente debido a las perturbaciones metabólicas generadas por la inserción aleatoria del T-DNA en el genoma vegetal, diferencias en el número de copias del DNA foráneo y el potencial silenciamiento génico (Tzfira y Citovsky 2006). No obstante, esta variabilidad metabólica entre líneas transformadas es diferente de la variabilidad y heterogeneidad inherente asociada con plantas transgénicas completas y con los cultivos de células y tejidos en sistemas biotecnológicos vegetales (Wilson y Roberts 2012), representando una estrategia real para la selección de líneas de raíces transformadas con altos rendimientos de producción de la hGH1.

Numerosos estudios han demostrado la factibilidad de desarrollar sistemas de expresión basados en células, tejidos y cultivos de órganos vegetales como una alternativa de producción a las proteínas terapéuticas humanas en biorreactor, no obstante sólo algunos procesos han sido desarrollados a niveles comerciales (Huang y McDonald 2012; Obembe *et al*. 2011), principalmente por los bajos rendimientos (10-200 mg/L). En el presente trabajo, el sistema de raíces transformadas de brócoli produjo correctamente la hGH1 en matraz y en biorreactor *airlift* modificado con tubo concéntrico de arrastre y malla metálica (Tabla 7). La expresión de la hGH1 por cultivos de raíces transformadas de brócoli no ha sido reportada hasta el momento, pero la producción observada y determinada fue comparable a lo reportado entre lo visto en cultivos de raíces transformadas (Doran 2006b; Kwon *et al*. 2003) de *Nicotiana tabacum.* Este sistema de expresión muestra producciones específicas de proteínas heterólogas en el intervalo de 0.0026% a 4% de la PTS. Sin embargo, los niveles de producción alcanzados fueron

menores a los reportados en un sistema híbrido de raíces transformadas somaclonales de *Nicotiana benthamiana* (30-60 µg/gPS) utilizando vectores de expresión episomales (Skarjinskaia *et al*. 2008); y otros sistemas vegetales como plantas de soya (0.0008% PTS), células en suspensión de tabaco (0.7 mg/L), semillas de maíz (5% PTS), cloroplastos de tabaco (7% PTS) y células en suspensión de arroz (57 mg/L) reportado por Russell *et al*. (2005), Staub *et al*. (2000) y (Kim *et al*. 2008). De manera similar, la producción observada fue menor a lo reportado en el contexto de producción microbiana y por sistemas animales; como *Escherichia coli* (25-100 mg/L; Chang *et al*. 1987; Rezaei y Zarkesh-Esfahani 2012), *Bacillus subtilis* (17-70 mg/L; Franchi *et al*. 1991; Özdamar *et al*. 2009), *Pichia pastoris* (49-240 mg/L; Ecamilla-Trevino *et al*. 2000; Apte-Deshpande *et al*. 2009), células de ovario de hámster chino (células CHO) (4-75 mg/L; Kunaparaju *et al*. 2005), leche de ratón (22mg/L; Devinoy *et al*. 1994), y leche de vaca transgénica (5 g/L; Salamone *et al*. 2006). Correspondientemente, la productividad específica de la hGH1 alcanzada para ambos sistemas, cultivos en matraz (213 ng hGH/g PS*d) y en biorreactor (325 ng hGH/g PS*d), fue menor que la reportada para otras proteínas heterólogas de mamífero; como anticuerpos producidos por cultivos transformados de *Nicotiana tabacum* a una tasa específica de acumulación de 0.22-0.40 mg/g PS*d (Banerjee *et al*. 2002; Sharp y Doran 2001; Wongsamuth y Doran 1997).

Así, aunque la producción de la hGH1 encontrada en esta investigación todavía requiere de optimización, se observó que el diseño convencional del biorreactor *airlift* debería ser modificado para lograr una distribución homogénea de las raíces a través de la jarra principal como ya ha sido ampliamente discutido (Huang y McDonald 2012; Peraza-Luna *et al*. 2001; Souret *et al*. 2003; Xu y Kieliszewski 2012). Como lo reportado por Peraza-

Luna *et al*. (2001) y Shadwick y Doran (2007), la inclusión de la malla metálica como un soporte de anclaje mejoró la proliferación de biomasa y facilitó, la cosecha de las raíces. También mejoró la distribución y fomentó la formación de pequeños agregados de raíces en el biorreactor que minimizó la necrosis asociada a la limitación de oxígeno en comparación con raíces crecidas en biorreactores *airlift* sin modificaciones (Fig. 18). Consecuentemente, la mejora en la acumulación de biomasa, PTS y hGH1 observada en los cultivos creciendo en biorreactores modificados puede ser explicada en términos de una mejor distribución de la biomasa y a un mejor acceso del tejido a los nutrientes.

Por otro lado, la degradación hidrolítica de las proteínas heterólogas ha sido continuamente reportada como un factor determinante para los rendimientos de proteínas heterólogas en sistemas de expresión vegetal (Wilson y Roberts 2012). No obstante, en el presente trabajo no se detectó actividad proteolítica significativa, tanto intracelular como extracelularmente (Fig. 9). Consecuentemente tampoco fueron observados fragmentos de degradación de la hGH1 por proteólisis. Las aparentes bandas de aproximadamente 14 kDa detectadas por el análisis de western blot a tiempos largos de exposición (Fig. 19B), aunque no fue analizada a fondo, pudiera ser proteína fragmentada resultante de los procesos de purificación en lugar de haber sido generada por proteólisis intracelular. Patrones similares de degradación de la hGH1 *in planta* han sido detectados en semillas de maíz (Russell *et al*. 2005) y plantas transplantómicas de tabaco (Staub *et al*. 2000), a diferencia de lo observado en este trabajo. Interesantemente, en el trabajo de Russell *et al.,* fragmentos generados por digestión tríptica permanecieron unidos por un puente disulfuro en la manera que se encuentra en la hGH1 nativa, y en el trabajo de Staub *et al.,* los fragmentos generados por la misma hidrólisis pero de la forma oxidada

de la hGH1 produjeron un péptido que también conservaba el puente disulfuro (T20S-ST21). Éste último péptido es muy similar al detectado en este estudio en los espectros de masas a 1400.76 m/z (Fig. 21) para ambas muestras analizadas. No obstante, los péptidos con los residuos que contienen cisteína libre T6 (~600 m/z), T16 (~1190 m/z), y T20 (~2600 m/z) reportados por Staub *et al.* (2000), resultantes de la forma reducida de la hGH1, no pudieron ser detectados en el análisis MALDI-TOF de la hGH1 heteróloga producida en este trabajo (Fig. 21). Por los tanto, estos resultados indican la existencia de los puentes disulfuro característicos de la hGH1 nativa en la hGH1 producida por los cultivos de brócoli. En este contexto, debe mencionarse que aunque el compuesto DTT fue usado durante el protocolo de preparación de muestra para el análisis de MALDI-TOF, las condiciones experimentales permitieron al DTT actuar como un protector redox de los grupos sulfidrilo libres para prevenir interacciones intramoleculares e intermoleculares entre péptidos en lugar de reducir los puentes disulfuro (Cleland 1964; Zheng *et al*. 1994). En consecuencia, estos resultados sugieren sólidamente que la proteína hGH1 expresada en este trabajo estaba en su correcta forma oxidada, por lo tanto también sugieren que los cultivos de raíces transformadas de brócoli tienen la capacidad de expresar, procesar y plegar la hGH1 heteróloga de manera análoga a la forma nativa de la hGH1 y posiblemente en su forma activa. Aunque la actividad biológica de la hGH1 expresada heterólogamente aún tiene que ser probada, los resultados en este trabajo demuestran que los cultivos de raíces transformadas de brócoli tienen potencial para convertirse en un sistema de expresión alternativo para la producción de la hGH1; y posiblemente para otras proteínas terapéuticas.

## 10. Conclusiones

- Los cultivos de raíces transformadas de brócoli son capaces de expresar de manera heteróloga la hGH1, con características estructurales similares a las de la proteína nativa
- Se establecieron condiciones básicas de cultivo en matraz y en biorreactor de laboratorio que permitirán cimentar investigación subsecuente para el establecimiento de un bioproceso de producción de proteínas heterólogas utilizando cultivos de raíces transformadas de brócoli.

## 11. Aportes

- Se observó que los cultivos de raíces establecidos poseen una variabilidad metabólica significativa independiente de la inherente a cada línea
- Las líneas élite seleccionadas producen cantidades de la proteína heteróloga similares a reportado en la literatura para estos sistemas de expresión
- Los cultivos de raíces transformadas establecidos fueron capaces de crecer adecuadamente en biorreactor tipo *airlift,* dando a estos cultivos las posibilidad de utilizarlos en bioprocesos confinados y controlados
- El análisis estructural de la proteína hGH1 expresada heterólogamente permitió determinar que los cultivos de raíces de brócoli son capaces de modificar postraduccionalmente la proteína al generar los puentes disulfuro y generar el extremo amino terminal como en la proteína hGH1 nativa.

## 12.Perspectivas y recomendaciones

- Optimizar condiciones de proceso y medio de cultivo que permitan aumentar el rendimiento de proteína heteróloga
- Probar otras configuraciones de biorreactores y regímenes de operación (fase gaseosa)
- Implementar estrategias que faciliten la recuperación de la proteína heteróloga
- Evaluar las capacidades del sistema para expresar proteínas que requieran modificaciones postraduccionales (glicosilaciones, ensamblado, etc.)
- Realizar ensayos de actividad biológica de la proteína heteróloga
- Evaluar el efecto de la optimización de codones en las secuencias expresadas heterólogamente.

## 13. Referencias


1. Allen DB, Carrel AL. (2004) Growth hormone therapy for Prader-Willi syndrome: a critical appraisal. J Pediatr Endocrinol Metab. 17 Suppl 4:1297-306.
2. Apte-Deshpande A, Rewanwar S, Kotwal P, Raiker VA, Padmanabhan S. (2009) Efficient expression and secretion of recombinant human growth hormone in the methylotrophic yeast Pichia pastoris: potential applications for other proteins. Biotechnol Appl Biochem. 54(**4**):197-205.
3. Arakawa T, Chong DK, Merritt JL, Langridge WH. (1997) Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. Transgenic Res. 6(**6**):403-13.
4. Banerjee S, Shang TQ, Wilson AM, Moore AL, Strand SE, Gordon MP, Doty SL. (2002) Expression of functional mammalian P450 2E1 in hairy root cultures. Biotechnol Bioeng. 77(**4**):462-466.
5. Bardor M, Cabrera G, Stadlmann J, Lerouge P, Cremata JA, Gomord V, Fitchette AC. (2009) N-glycosylation of plant recombinant pharmaceuticals. Methods Mol Biol. 483:239-64.
6. Barsh GS, Seeburg PH, Gelinas RE. (1983) The Human Growth-Hormone Gene Family - Structure and Evolution of the Chromosomal Locus. Nucleic Acids Res. 11(**12**):3939-3958.
7. Bloom A. (2010). Mineral Nutrition. En: Taiz L ZE, editor. Plant Physiol. 5th Edition ed. Sunderland, MA: Sinauer Assoc. p 107-130.
8. Bolar K, Hoffman AR, Maneatis T, Lippe B. (2008) Long-term safety of recombinant human growth hormone in turner syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 93(**2**):344-51.
9. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-54.
10. Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA, Waters MJ. (2008) Growth hormone receptor; mechanism of action. Int J Biochem Cell Biol. 40(**10**):1984-9.
11. Broothaerts W, Mitchell HJ, Weir B, Kaines S, Smith LMA, Yang W, Mayer JE, Roa-Rodriguez C, Jefferson RA. (2005) Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. Nature. 433(**7026**):629-633.
12. Calva Calva G., López Sánchez C., Ochoa Alejo N., Pérez Vargas J., Palma Cruz F., Rojas Chavez C. **(2005)**. Metabolismo de fenilpropanoides en cultivos de raíces de *Capsicum* spp., transformadas con un fragmento del gen de PAL de perejil. 14 International Scientific Congress CNIC 2005. Centro Nacional de Investigaciones Científicas de la República de Cuba. La Havana, Cuba. 27-30 de junio. CD. Trabajo T01-PP-097.
13. Calva Calva G., García López E., Pérez Vargas J. (2012). Expresión de proteínas heterólogas en sistemas vegetales. Avance y Perspectiva 4(**3**). http://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/327/

14. Calva-Calva G, Pérez-Vargas J. (2005) Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria. 6(**11**).

15. Clauser KR, Hall SC, Smith DM, Webb JW, Andrews LE, Tran HM, Epstein LB, Burlingame AL. (1995) Rapid mass spectrometric peptide sequencing and mass matching for characterization of human melanoma proteins isolated by two-dimensional PAGE. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92(**11**):5072-6.

16. Cleland WW. (1964) Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups*. Biochem. 3(**4**):480-482.

17. Cramer CL, Boothe JG, Oishi KK. (1999) Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. Curr Top Microbiol Immunol. 240:95-118.

18. Cuttler L, Silvers JB, Singh J, Marrero U, Finkelstein B, Tannin G, Neuhauser D. (1996) Short stature and growth hormone therapy. A national study of physician recommendation patterns. JAMA. 276(**7**):531-7.

19. Chang CN, Rey M, Bochner B, Heyneker H, Gray G. (1987) High-Level Secretion of Human Growth-Hormone by *Escherichia coli*. Gene. 55(**2-3**):189-196.

20. Chantalat L, Jones ND, Korber F, Navaza J, Pavlovsky AG. (1995) The crystal-structure of wild-type growth-hormone at 2.5 angstrom resolution. Protein Pept Lett. (**2**):333-340.

21. Chong DK, Langridge WH. (2000) Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. Transgenic Res. 9(**1**):71-8.

22. Chong DK, Roberts W, Arakawa T, Illes K, Bagi G, Slattery CW, Langridge WH. (1997) Expression of the human milk protein beta-casein in transgenic potato plants. Transgenic Res. 6(**4**):289-96.

23. Christey M, Braun R. (2004). Production of Hairy Root Cultures and Transgenic Plants by *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation. En: Peña L, editor. Transgenic Plants: Methods and Protocols: Humana Press. p 47-60.

24. Dalsgaard K, Uttenthal A, Jones TD, Xu F, Merryweather A, Hamilton WD, Langeveld JP, Boshuizen RS, Kamstrup S, Lomonossoff GP and others. (1997) Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. Nat Biotechnol. 15(**3**):248-52.

25. Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends Plant Sci. 6(**5**):219-26.

26. Devinoy E, Thepot D, Stinnakre MG, Fontaine ML, Grabowski H, Puissant C, Pavirani A, Houdebine LM. (1994) High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. Transgenic Res. 3(**2**):79-89.

27. Doran PM. (2006a) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. Trends Biotechnol. 24(**9**):426-432.

28. Doran PM. (2006b) Loss of secreted antibody from transgenic plant tissue cultures due to surface adsorption. J Biotechnol. 122(**1**):39-54.

29. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal Chem. 28(**3**):350-356.

30. Ecamilla-Trevino LL, Viader-Salvado JM, Barrera-Saldana HA, Guerrero-Olazaran M. (2000) Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. Biotechnol Lett. 22(**2**):109-114.

31. Edwards K, Johnstone C, Thompson C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res. 19(**6**):1349.

32. Fischer R, Schillberg S, Hellwig S, Twyman RM, Drossard J. (2012) GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. Biotechnol Adv. 30(**2**):434-9.

33. Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM. (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. Curr Opin Plant Biol. 7(**2**):152-158.

34. Franchi E, Maisano F, Testori SA, Galli G, Toma S, Parente L, Deferra F, Grandi G. (1991) A New Human Growth-Hormone Production Process Using a Recombinant *Bacillus subtilis* Strain. J Biotechnol. 18(**1-2**):41-54.

35. García-López E. (2009). Establecimiento de cultivos de raíces de *Brassica oleracea* var. *italica* (brócoli) transformadas con el cDNA del gen1 de la hormona del crecimiento humano. México D. F.: CINVESTAV-IPN. Tesis de maestría.

36. García-López Edgar, Ramos-Ramírez Emma Gloria, Ariza-Castolo Armando, Pérez Vargas Josefina, Gómez-Guzmán Octavio, Calva-Calva Graciano (2008). Inducción de raíces transformadas de *Brassica oleracea* var. *italica* (Brócoli) útiles para la producción de proteínas heterólogas con actividad terapéutica. Tecnocultura **(19)** 26-34. ISSN 1870-7157

37. Gaume A, Komarnytsky S, Borisjuk N, Raskin I. (2003) Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. Plant Cell Rep. 21(**12**):1188-93.

38. Gils M, Kandzia R, Marillonnet 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(**6**):613-620.

39. Guillon S, Tremouillaux-Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P. (2006) Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. Trends Biotechnol. 24(**9**):403-9.

40. Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R. (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. Nat Biotechnol. 22(**11**):1415-22.

41. Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C. (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90(**11**):5011-5.

42. Hood EE, Woodard SL, Horn ME. (2002) Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants--myths and realities. Curr Opin Biotechnol. 13(**6**):630-5.

43. Hu ZB, Du M. (2006) Hairy root and its application in plant genetic engineering. J Integr Plant Biol. 48(**2**):121-127.

44. Huang T-K, McDonald KA. (2012) Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures. Biotechnol Adv. 30(**2**):398-409.

45. Huynh ML, Russell P, Walsh B. (2009) Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis. Methods Mol Biol. 519:507-13.

46. Jefferson R. (1987) Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system. Plant Mol Biol Rep. 5(**4**):387-405.

47. Jimenez CR, Huang L, Qiu Y, Burlingame AL. (2001) In-gel digestion of proteins for MALDI-MS fingerprint mapping. Curr Protoc Protein Sci. Chapter 16:Unit 16 4.

48. Jung H, Rosilio M, Blum WF, Drop SL. (2008) Growth hormone treatment for short stature in children born small for gestational age. Adv Ther. 25(**10**):951-78.

49. Kang TJ, Yang MS. (2004) Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. BMC Biotechnol. 4(**20**).

50. Kim TG, Baek MY, Lee EK, Kwon TH, Yang MS. (2008) Expression of human growth hormone in transgenic rice cell suspension culture. Plant Cell Rep. 27(**5**):885-891.

51. Kim TG, Kim HM, Lee HJ, Shin YJ, Kwon TH, Lee NJ, Jang YS, Yang MS. (2007) Reduced protease activity in transformed rice cell suspension cultures expressing a proteinase inhibitor. Protein Expr Purif. 53(**2**):270-274.

52. Krysiak R, Gdula-Dymek A, Bednarska-Czerwinska A, Okopien B. (2007) Growth hormone therapy in children and adults. Pharmacol Rep. 59(**5**):500-16.

53. Kunaparaju R, Liao M, Sunstrom NA. (2005) Epi-CHO, an episomal expression system for recombinant protein production in CHO cells. Biotechnol Bioeng. 91(**6**):670-7.

54. Kusnadi AR, Nikolov ZL, Howard JA. (1997) Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. Biotechnol Bioeng. 56(**5**):473-84.

55. 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(**7**):870-875.

56. Laemmli UK. (1970) Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. Nature. 227(**5259**):680-&.

57. Larrick JW, Thomas DW. (2001) Producing proteins in transgenic plants and animals. Curr Opin Biotechnol. 12(**4**):411-8.

58. Leite A, Kemper EL, da Silva MJ, Luchessi AD, Siloto RMP, Bonaccorsi ED, El-Dorry HF, Arruda P. (2000) Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. Mol Breed. 6(**1**):47-53.

59. López Sánchez Claudia, Ochoa Alejo Neftali, Lozoya Gloria Edmundo, Villarreal Ortega Maria Luisa, Esparza García Fernando, Montes Horcasitas Maria del Carmen, Calva-Calva Graciano (2003). Metabolismo de capsaicinoides en cultivos *in vitro* de *Capsicum* spp que sobreexpresan la PAL. XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. 2-6 Noviembre. Cancún, Quintana Roo. (Cartel 233). Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas **(34)** 119-120.

60. Ma JK, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T. (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. Science. 268(**5211**):716-9.

61. Ma SW, Zhao DL, Yin ZQ, Mukherjee R, Singh B, Qin HY, Stiller CR, Jevnikar AM. (1997) Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. Nat Med. 3(**7**):793-6.

62. Magnuson NS, Linzmaier PM, Reeves R, An G, HayGlass K, Lee JM. (1998) Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. Protein Expr Purif 13(**1**):45-52.

63. Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ. (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93(**11**):5335-40.

64. McCormick AA, Kumagai MH, Hanley K, Turpen TH, Hakim I, Grill LK, Tuse D, Levy S, Levy R. (1999) Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96(**2**):703-8.

65. Menzel G, Harloff HJ, Jung C. (2003) Expression of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Appl Microbiol Biotechnol. 60(**5**):571-576.

66. Miele L. (1997) Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. Trends Biotechnol. 15(**2**):45-50.

67. Miller GL. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal Chem. 31(**3**):426-428.

68. Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu ZF, Steplewski K, Hooper DC, Koprowski H, Yusibov V. (1998) Immunization against rabies with plant-derived antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95(**5**):2481-5.

69. Moura JF, DeLacerda L, Sandrini R, Borba FM, Castelo DN, Sade ER, Sella S, Minozzo JC, Callefe LG, Figueiredo BC. (2004) ELISA for determination of human growth hormone: Recognition of helix 4 epitopes. J Biomed Biotechnol. (**3**):143-149.

70. Neely EK, Rosenfeld RG. (1994) Use and abuse of human growth hormone. Annu Rev Med. 45:407-20.

71. Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV. (2011) Advances in plant molecular farming. Biotechnol Adv. 29(**2**):210-22.

72. Özdamar TH, Şentürk B, Yilmaz ÖD, Çalık G, Çelik E, Çalık P. (2009) Expression system for recombinant human growth hormone production from *Bacillus subtilis*. Biotechnol Prog. 25(**1**):75-84.

73. Peraza-Luna F, Rodríguez-Mendiola M, Arias-Castro C, Bessiere J-M, Calva-Calva G. (2001) Sotolone Production by Hairy Root Cultures of *Trigonella foenum-graecum* in Airlift with Mesh Bioreactors. J Agric Food Chem. 49(**12**):6012-6019.

74. Rezaei M, Zarkesh-Esfahani SH. (2012) Optimization of production of recombinant human growth hormone in Escherichia coli. J Res Med Sci. (**17**):681-5.

75. Rodríguez-Mendiola MA, Stafford A, Cresswell R, Arias-Castro C. (1991) Bioreactors for growth of plant roots. Enzyme Microb Technol. 13(**9**):697-702.

76. Ruggiero F, Exposito JY, Bournat P, Gruber V, Perret S, Comte J, Olagnier B, Garrone R, Theisen M. (2000) Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. FEBS Lett 469(**1**):132-6.

77. Russell DA, Spatola LA, Dian T, Paradkar VM, Dufield DR, Carroll JA, Schlittler MR. (2005) Host limits to accurate human growth hormone production in multiple plant systems. Biotechnol Bioeng 91(**4**):522-522.

78. Sala F, Manuela Rigano M, Barbante A, Basso B, Walmsley AM, Castiglione S. (2003) Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. Vaccine. 21(**7-8**):803-8.

79. Salamone D, Barañao L, Santos C, Bussmann L, Artuso J, Werning C, Prync A, Carbonetto C, Dabsys S, Munar C and others. (2006) High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. J Biotechnol. 124(**2**):469-472.

80. Schenk RU, Hildebrandt AC. (1972) Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant-Cell Cultures. Can J Bot. 50(**1**):199-204.

81. Sevon N, Oksman-Caldentey KM. (2002) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. Planta Med. 68(**10**):859-68.

82. Shadwick FS, Doran PM. (2005). Foreign Protein Expression Using Plant Cell Suspension and Hairy Root Cultures. Molecular Farming: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p 13-36.

83. Shadwick FS, Doran PM. (2007) Propagation of plant viruses in hairy root cultures: A potential method for in vitro production of epitope vaccines and foreign proteins. Biotechnol Bioeng. 96(**3**):570-583.

84. Sharp JM, Doran PM. (2001) Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. Biotechnol Prog. 17(**6**):979-92.

85. Skarjinskaia M, Karl J, Araujo A, Ruby K, Rabindran S, Streatfield SJ, Yusibov V. (2008) Production of recombinant proteins in clonal root cultures using episomal expression vectors. Biotechnol Bioeng. 100(**4**):814-819.

86. Smith ML, Mason HS, Shuler ML. (2002) Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in plant cell culture: Kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form. Biotechnol Bioeng. 80(**7**):812-22.

87. Souret FF, Kim Y, Wyslouzil BE, Wobbe KK, Weathers PJ. (2003) Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. Biotechnol Bioeng. 83(**6**):653-667.

88. Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PTJ, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L and others. (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. Nat Biotechnol. 18(**3**):333-338.

89. Stoger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, Nicholson L, Drossard J, Williams S, Keen D, Perrin Y, Christou P and others. (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. Plant Mol Biol. 42(**4**):583-90.

90. Strobl JS, Thomas MJ. (1994) Human growth hormone. Pharmacol Rev. 46(**1**):1-34.

91. Sundaresan V, Springer P, Volpe T, Haward S, Jones JD, Dean C, Ma H, Martienssen R. (1995) Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. Genes Dev. 9(**14**):1797-810.

92. Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ. (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. Nat Med. 4(**5**):607-9.

93. Terashima M, Ejiri Y, Hashikawa N, Yoshida H. (1999) Effect of osmotic pressure on human α1-antitrypsin production by plant cell culture. Biochem Eng J. 4(**1**):31-36.

94. Trexler MM, McDonald KA, Jackman AP. (2002) Bioreactor production of human alpha(1)-antitrypsin using metabolically regulated plant cell cultures. Biotechnol Prog. 18(**3**):501-8.

95. Tuboly T, Yu W, Bailey A, Degrandis S, Du S, Erickson L, Nagy E. (2000) Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. Vaccine. 18(**19**):2023-8.

96. Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R. (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. Trends Biotechnol. 21(**12**):570-8.

97. Tzfira T, Citovsky V. (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Curr Opin Biotechnol. 17(**2**):147-54.

98. Wilson SA, Roberts SC. (2012) Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. Plant Biotechnol J. 10(**3**):249-68.

99. Wongsamuth R, Doran PM. (1997) Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. Biotechnol Bioeng. 54(**5**):401-15.

100. Xu J, Dolan MC, Medrano G, Cramer CL, Weathers PJ. (2012) Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. Biotechnol Adv. 30(**5**):1171-1184.

101. Xu J, Kieliszewski MJ. (2012) A novel plant cell bioproduction platform for high-yield secretion of recombinant proteins. Methods Mol Biol. 824:483-500.

102. Xu J, Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M. (2000) Increased heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation through extracellular proteases inhibition by pelleted growth. Biotechnol Prog. 16(**2**):222-7.

103. Xu ZF, Teng WL, Chye ML. (2004) Inhibition of endogenous trypsin- and chymotrypsin-like activities in transgenic lettuce expressing heterogeneous proteinase inhibitor SaPIN2a. Planta. 218(**4**):623-629.

104. Ye H, Hill J, Kauffman J, Han X. (2010) Qualitative and quantitative comparison of brand name and generic protein pharmaceuticals using isotope tags for relative and absolute quantification and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry. Anal Biochem. 400(**1**):46-55.

105. Zeitlin L, Olmsted SS, Moench TR, Co MS, Martinell BJ, Paradkar VM, Russell DR, Queen C, Cone RA, Whaley KJ. (1998) A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. Nat Biotechnol. 16(**13**):1361-4.

106. Zheng L, White RH, Cash VL, Dean DR. (1994) Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. Biochem. 33(**15**):4714-4720.

# 14. Anexos

**Cell Culture and Tissue Engineering** **Biotechnology Progress**
**DOI 10.1002/btpr.1829**

MALDI-TOF characterization of hGH1 produced by hairy root cultures of *Brassica oleracea* var. *italica* grown in an airlift with mesh bioreactor

Edgar García López[1], Emma Gloria Ramos Ramírez[1], Armando Ariza-Castolo[2], Josefina Pérez-Vargas[3], Octavio Gómez Gúzman[1], Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez[4], Graciano Calva Calva[*1]

[1]Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, México Distrito Federal. CP 07360. Tel: 52 (55) 57473800 Ext. 4348

[2]Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, México Distrito Federal. CP 07360. Tel: 52 (55) 57473800 Ext. 3727

[3]Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. División Ingeniería Bioquímica, Posgrado en Ingeniería Bioquímica. Av. Tecnológico S/N. Colonia Valle de Anáhuac, Ecatepec de Morelos, Estado de México, CP 55210. Tel: 52 (55) 50002375

[4]Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Madero y Dr. Aguirre Pequeño S/N. Col. Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, México. CP 64460. Tel: 52 (55) 57473800

*Corresponding author: Graciano Calva Calva at gcalva@cinvestav.mx

Running title: hGH1 production by broccoli hairy roots

**This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as**
**doi: 10.1002/btpr.1829**
**© 2013 American Institute of Chemical Engineers Biotechnol Prog**
**Received: Mar 26, 2013; Revised: Sep 20, 2013; Accepted: Sep 26, 2013**

Accepted Article

Abstract

Expression systems based on plant cells, tissue, and organ cultures have been investigated as an alternative for production of human therapeutic proteins in bioreactors. In this work, hairy root cultures of *Brassica oleracea* var. *italica* (broccoli) were established in an airlift with mesh bioreactor to produce isoform 1 of the human growth hormone (hGH1) as a model therapeutic protein. The hGH1 cDNA was cloned into the pCAMBIA1105.1 binary vector to induce hairy roots in hypocotyls of broccoli plantlets via *Agrobacterium rhizogenes*. Most of the infected plantlets (90%) developed hairy roots when inoculated before the appearance of true leaves, and keeping the emerging roots attached to hypocotyl explants during transfer to solid Schenk and Hildebrandt medium. The incorporation of the cDNA into the hairy root genome was confirmed by PCR amplification from genomic DNA. The expression and structure of the transgenic hGH1 was assessed by ELISA, western blot, and MALDITOF-MS analysis of the purified protein extracted from the biomass of hairy roots cultivated in bioreactor for 24 days. Production of hGH1 was 5.1±0.42 µg/g dry weight (DW) for flask cultures, and 7.8±0.3 µg/g DW for bioreactor, with productivity of 0.68±0.05 and 1.5±0.06 µg/g DW*d respectively, indicating that the production of hGH1 was not affected by the growth rate, but might be affected by the culture system. These results demonstrate that hairy root cultures of broccoli have potential as an alternative expression system for production of hGH1, and might also be useful for production of other therapeutic proteins.

Somatotropin, Heterologous protein, *Agrobacterium rhizogenes*, pCAMBIA, GUSPlus.

Accepted Article

## Introduction

Plant-based molecular farming techniques using transgenic plants, and plant cell, tissue, and organ cultures have been investigated as alternative production platforms for heterologous proteins produced in mammalian, microbial and insect cell systems.[1,2] Currently, commercial plant cell culture processes include tobacco and carrot cell suspension cultures in bioreactors with defined synthetic medium, and a number of plant-derived pharmaceutical heterologous proteins are close to being brought to market.[3,4] Plant systems can be grouped into three categories: seed-based systems, leaf-based systems and bioreactor-based systems.[5] Hairy root cultures are bioreactor-based systems evaluated mainly for the production of therapeutic proteins and secondary metabolites.[5,6] To establish hairy root systems, explants from the host plant are infected with *Agrobacterium rhizogenes* holding a hairy root-inducing plasmid (Ri-plasmid). When the explant is infected, the DNA between the TR and TL regions of the Ri-plasmid, known as T-DNA, is transferred to the plant cell and randomly integrated into the nuclear genome, producing stably transformed root tissue.[7] These regions hold the genes to induce the expression of the hairy root phenotype and opines, respectively; however, the inclusion of just the TL and TR DNA borders of 25 base pair direct repeats, lacking the DNA for these genes, in binary vectors is sufficient to transfer the T-DNA to the plant cell's genome (Figure 1). Typically, hairy roots grow faster than non-transformed roots, and can be propagated indefinitely in vitro in medium without growth regulators. For heterologous protein production, *A. rhizogenes* can transfer the T-DNA from a second plasmid, which may be a binary vector or a disarmed vector harboring the DNA of interest along with selection and reporter genes. Stable transformation is preferred for heterologous protein production.[8] The major advantages of stable transgenic roots are that they are genetically homogeneous, morphologically stable and the heterologous protein production trait is inheritable. Therefore, they are capable of synthesizing the heterologous proteins for long periods of time.[9,10] In comparison with whole plants, hairy root cultures as bioreactor-based systems offer greater control over the expression environment, shorter production cycles and cheaper downstream and purification processes.[7] However, some of the most important limitations for the commercial exploitation of hairy roots-based systems for production of secondary metabolites and heterologous proteins have been the low yields, productivity and the design of proper bioreactors that permit both growth of the root tissues, normally unevenly distributed through the bioreactor, and expression of the transgenic product. In any case, the economic viability of the production process seems to be ensured by eliminating low yields and low recovery by selecting elite lines with high expression levels, and by developing scalable manufacturing processes.[7]

In this work, hairy root cultures of *Brassica oleracea* var. *italica* (broccoli) were used to evaluate the production of isoform 1 of the human growth hormone (hGH1), or somatotropin, which has been primarily developed using genetically modified microbial systems.[11] Although successful production of hGH1 has been achieved in other plant-based systems, including tobacco seeds,[12] tobacco chloroplasts,[13] in transient expression systems based on viral constructs,[14] in transgenic rice cell suspension cultures,[15] and in somaclonal roots of *Nicotiana benthamiana*;[16] reports of expression of hGH1 in plants or hairy roots of broccoli or any other Brassicaceae species were not found. The native hGH1 protein is produced by the pituitary gland, and consists of 191 amino acids that fold into a mature 22

kDa protein containing four helices and two disulfide bonds.[17] It belongs to a family of five somatotropin proteins encoded in a gene cluster, among which hGH1 is the predominant isoform. Human growth hormone has diverse effects on the human body, and influences several processes including cell proliferation, protein synthesis and lipolysis. Therapeutic applications include the treatment of hGH deficiency, Turner syndrome, idiopathic short stature, Prader-Willi syndrome and chronic renal insufficiency.[18] Among all potential plant-based expression systems, broccoli was selected as the model system as it is not recalcitrant to agrotransformation,[19] and transformed broccoli plants can be regenerated efficiently,[20] and accumulate high levels of protein.[21] Thus, here we report the production of hGH1 by hairy root cultures of broccoli in both conical flasks and in a mesh airlift bioreactor. The results demonstrate the potential of this plant expression system for biotechnological production of hGH1, and suggest the possibly of use for production of other therapeutic proteins.

## Materials and Methods

### Chemicals and enzymes

All chemicals including X-Gluc, Bradford reagent, and the culture media components, along with bovine pancreatic trypsin, were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Tecsiquim (Toluca, ME, MX). The restriction enzymes were purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA, UK). The ligase T4 and PCR kit were purchased from Invitrogene (NY, USA).

### Bacterial strains

*Agrobacterium rhizogenes* LBA9402 (plasmid pRi1855),[22] and E. coli DH5α were used.

### Plasmids

The pBluescript SK+ plasmid holding the hGH1 cDNA (pBShGH) was obtained from Open Biosystems, USA. The pCAMBIA1105.1 binary vector containing the pBR322 ori and bom sites for replication in *Escherichia coli*, the aadA1 bacterial spectinomycin and streptomycin resistance genes, and the pVS1 ori for replication in Agrobacterium,[23] were purchased from CambiaLabs (Brisbane, Australia). The T-DNA in such vector (Figure 1) holds the hygromycin resistance gene (*hptII*), the GUSPlus reporter gene and the cauliflower mosaic virus 35S promoter, flanked by the TR and TL borders from the Ri plasmid contained in the strain LBA9402.

### Cloning the hGH1 cDNA in A. rhizogenes LBA9402

The *A. rhizogenes* strain carrying the hGH1 cDNA used to establish hairy root lines producing hGH1 was generated by transformation with the binary vector pCAMhGHE. The hGH1 cDNA was amplified by PCR from the pBShGH plasmid using the 5'–tggtctctcatggcaaggcccaactcc–3' (forward) and 5'–tggtctccgatctggatgcacttaatttta–3' (reverse) primers, which included the *Eco*31l (5'-ggtctcn-3') restriction site, and the overhang sequences for the *Nco*I (5´-catg) and the *Bgl*II (5´-gatc) restriction sites. The amplified hGH1 cDNA was digested with Eco31l and cloned between the *Nco*I and *Bgl*II restriction sites into the plant expression cassette of the T-DNA contained in the pCAMBIA1105.1 plasmid (Figure 1). The resulting plasmid (pCAMhGHE), was introduced into A. rhizogenes LBA9402 by electroporation (2.5 kV, 5 ms, 200 Ω).

Accepted Article

### Establishment of hairy root cultures

Induction of hairy roots was accomplished via Agrobacterium-infection of hypocotyls of 2-week-old seedlings of broccoli. Surface sterile seeds were germinated at 27 ± 2 °C, 5,400 lux, on B5 medium,[24] supplemented with sucrose 3% and gelrite 0.2%. Hypocotyls were punctured 1-cm below the cotyledons with a needle immersed in a 48-h culture of A. rhizogenes. The A. rhizogenes strains included the wild-type A. rhizogenes LBA9402, a clone transformed with the pCAMBIA1105.1 binary vector and another clone transformed with the construct pCAMhGHE. Flasks with the infected plantlets were incubated 15 days to induce hairy roots in the hypocotyls under the conditions described for germination. Hairy root cultures were established by transferring hypocotyl explants (1-cm) carrying the hairy roots emerging from the punctured site (Figure 2A) into semisolid SH medium[25] containing sucrose (3% w/v), gelrite (0.2% w/v), and cefotaxime (400 µg/mL). To establish cultures in conical flasks, axenic root tissue from semisolid medium was transferred to 125 mL conical flasks containing 50 mL SH liquid medium and incubated 15-20 d on an orbital shaker at 110 rpm, at 27 ± 2 °C and 8,400 lux. Cultures of non-transformed roots were established from 1–3 cm root explants from non-infected plants and used as control. To screen hairy roots carrying the pCAMBIA 1105.1 or the pCAMhGHE vector, hygromycin (100 µg/mL) was added to the medium and assayed for β-glucuronidase activity.[26]

### Sucrose and biomass assays

Sucrose uptake was estimated by the phenol-sulfuric method.[27] Fresh weight was evaluated after washing the root tissue with distilled water, draining, and blotting on absorbent paper. Dry weight was evaluated by oven-drying the rinsed hairy roots at 90 °C for 24 h.

### Cultures in Bioreactor

A 1.5 L mesh airlift bioreactor was used (Fig 5). It has a height/diameter ratio of 21.3:9.7 cm (2.19). The ratio between the bioreactor vessel and the draft tube diameter was 9.7:4 cm (2.42), and the ratio between the vessel and the mesh diameter was 9.7:7.8 cm (1.24). The bioreactor was prepared with 1.25 L of Schenk and Hildebrandt (SH) medium supplemented with sucrose 30 g/L and $(NH_4)_2SO_4$ 300 mg/L (2.3 mM), sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min, and inoculated with 4 g/L of hairy roots from a 10 day culture. The bioreactor was maintained in an incubation room at 27 ± 2 °C, 800 lx, and 0.2 vvm. Sampling was performed by withdrawing 10 mL of medium. After 24 days, the whole biomass was collected and used for extraction of protein and the hGH1 purification experiments.

### Total soluble protein (TSP) extraction

The fresh biomass from whole cultures was collected, washed with distilled water, weighed, treated with liquid nitrogen, and ground. The TSP was extracted by mixing one gram of biomass with 3 mL extraction buffer of the following composition: 25 mM Tris-HCl pH 7, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1.5% w/v polyvinylpolypyrrolidone (PVPP; c.a 1 million Daltons), 1.6 mM PMSF and 0.25% v/v Triton X-100. The mixture was stirred for 1 h at 4 °C and centrifuged at 8,900 x g for 20 min at 4 °C. Total protein was quantified by the Bradford method.[28]

### Extraction of genomic DNA from roots

Genomic DNA was extracted from roots based on protocols reported in the literature.[29,30] Samples of fresh tissue (0.5 g) were homogenized in liquid nitrogen and mixed with 2 mL of DNA extraction buffer (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCL pH 7.5, 50 mM EDTA pH 7.5 and 1.5% PVPP). Then, 200 µl 20% SDS were added, vortexed 30 s, and incubated at 65 °C for 10 min. The mixture was centrifuged at 8,900 x g for 10 min at 4 °C and the supernatants transferred to a new tube. An equal volume of phenol/chloroform/isoamylic alcohol (25:24:1) was added, the mixture was stirred for 30 s and then centrifuged at 15,600 x g for 5 min at 4 °C. The supernatant containing the genomic DNA was recovered and the quantity and the purity were determined by absorbance at 260 nm and by the $A_{260}/A_{280}$, $A_{260}/A_{230}$ ratios respectively.

### Isolation and western blot analysis of hGH

The TSP was fractionated by tangential filtration in 50 kDa cut-off Amicon tubes (Millipore, MA, USA). The <50 kDa fractions were separated by ion exchange (HiPrep 16/10 QFF, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and gel filtration (Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare) chromatography. Fractions containing proteins with molecular weights close to that of hGH1 were collected and resolved by SDS-PAGE on 15% acrylamide gels. The resolved samples were blotted onto PVDF membranes, and then the membranes were blocked with 5% non-fat milk in PBS-T (phosphate buffered saline, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, $Na_2HPO_4$ 10 mM, $KH_2PO_4$ 2 mM, pH 7.4) before incubation with 1:200 mouse monoclonal anti-human growth hormone antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA). The membranes were then incubated with 1:15,000 of the secondary antibody, an anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Pennsylvania, USA). The target protein was visualized via chemiluminescent detection (Millipore, Massachusetts USA) on X-ray film. A transgenic hGH1 protein purchased from Pfizer (NY, NY, USA) was used as standard and reference compound.

### Detection and quantification of hGH1 by ELISA

Measurement of hGH1 was performed with an anti-hGH ELISA kit (Biosource, Camarillo, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

### In-gel tryptic digestion of hGH1

In-gel tryptic digestion of the standard and the purified hGH1 protein was performed in 25 mM $(NH_4)HCO_3$ (pH 7.2) as described by Jiménez et al.[31] and Huynh et al.[32] Briefly, 3 µg of protein were resolved by SDS–PAGE on 15% polyacrylamide gel. The hGH1 band was transferred to an eppendorf tube for destaining. The gel was covered with 10 mM DTT and incubated 30 min at 56 °C. The tube was allowed to reach room temperature; the DTT was replaced with a volume of 55 mM iodoacetamide and incubated 15 min at room temperature in darkness. The washed and dried gel was immersed in 60-100 µl bovine pancreatic trypsin (12.5 ng/mL in $(NH_4)HCO_3$). The reaction mixture was incubated 12 h at 37°C, sonicated 10 min and extracted with acetonitrile:trifluoroacetic acid 1% (1:1 v/v). Sonication and extraction was repeated 3 times and the supernatant was pooled and vacuum-dried. The digested protein was resuspended in 10 µl of acetonitrile:trifluoroacetic acid 0.2% (1:1 v/v) for MALDI TOF analysis.

### Identification and characterization of hGH1 by MALDI TOF

The in-gel digested samples were desalted using ZipTip C18 pipette tips (Millipore, MA, USA), mixed with the MALDI matrix (8 mg/mL α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) and spotted on a MALDI plate. Samples were analyzed in a 4800 plus MALDI TOF/TOF analyzer (Applied Biosystems) as described by Ye et al.[33] Mass spectra in the range of m/z 800-4000 were acquired in the positive mode. Peptide identification and characterization of the transgenic hGH1 protein was accomplished by MS peptide sequencing and mass matching analysis as described by Henzel et al.,[34] and Clauser et al.,[35] but using the SwissProt database and the ProteinPilot™ Software (Applied Biosystems).

### Statistical analyses

The SPSS V.10 statistical package (SPSS Inc, 2005) software was used. Means comparison for hGH1 production and productivity was conducted using a general linear model ANOVA and Tukey's test. A probability level of $<0.05$ was considered to indicate significance.

## Results

### Establishment of hairy root cultures transformed with the hGH1 cDNA

As a prerequisite for expressing the hGH1 cDNA in hairy roots of broccoli, an efficient transformation and propagation protocol was first established. Induction of hairy roots was accomplished by using the standard puncturing method (Figure 2A); however roots died after separation from the plantlet and during transference to semisolid medium. Fortunately, it was found that keeping the emerging roots attached to hypocotyl explants substantially improved their survival (Figure 2B). Thus, two weeks after inoculation with Agrobacterium, 90% of the plantlets developed adventitious roots showing the phenotype of transformed roots (Figure 2A). They were hairy, with plagiotropic growth and thicker than normal roots. On the other hand, the non-transformed roots and those transformed with the A. rhizogenes wild-type strain, which transfers the T-DNA contained in the pRi1855 plasmid, showed no β-glucuronidase activity (Figure 2C and 2E). Thus, 25 lines of hairy roots putatively transformed with the pCAMhGHE T-DNA (Figure 1) containing the hGH1 cDNA were established in semisolid medium; however only 12 were resistant to the presence of hygromycin, showing extensive and intense blue coloration after the β-glucuronidase assay (Figure 2F–2H), similar to those transformed with the T-DNA from pCAMBIA1105.1 (Figure 2D).

### Screening of elite hairy root lines for transgenic hGH1 production in conical flask

To evaluate the potential of the 12 established hairy root lines for hGH1 production, cultures in conical flasks were incubated for 20 days and their protein extracts analyzed by ELISA (Figure 3). The hGH1 protein was not detected in the culture medium of any transformed root line, non-transformed roots (N), or roots transformed with the pCAMBIA1105.1 T-DNA (C). However, it was positively detected and quantified in the TSP extracts from each line transformed with the pCAMhGHE T-DNA (Figure 3). High variability in the production of hGH1 protein and biomass accumulation was observed among the 12 lines (six groups of hGH1 production means at significance of $p < 0.05$ were found). The TSP content in these cultures ranged from 9 to 21 mg/g dry weight (DW), and

of that 0.0015 – 0.9% corresponded to hGH1. Additionally, a lack of correlation between the production of hGH1 and growth and productivity was observed among the 12 hairy root lines, indicating that the production of the recombinant protein was not affected by the cell growth of the transformed cultures. For instance, the biomass of six transformed lines (12, 4, 7, 22, 17, and 18) was similar or superior to that exhibited by the non-transformed (N) and the pCAMBIA-transformed (C) cultures; however the hGH1 production and productivity was clearly different between the six lines. Hence, lines 17 and 18 were statistically equivalent, showing the highest hGH1 production. From the statistical analysis, the variability for the production of the transgenic protein within each line was usually less than 10%; the maximum coefficient of variation (CV) was 10.9 % for line 7. However, high variation among lines was observed (standard deviation of 3.3 µg hGH1/g DW; CV 56.7 %), ranging from 0.2 µg hGH1/g DW in lines 4 and 12, to 10 µg hGH1/g DW in line 18. Also, variability was similar for the productivity and biomass values between lines. For instance, productivity for line 17 was 0.55 ± 0.01 µg hGH1/g DW*day, whereas for line 18 it was significantly higher (0.64 ± 0.02 µg hGH1/g DW*day) (Tukey $\alpha$= 0.05). Hence, as lines 6, 7, 17 and 18 were medium and high hGH1 producers, they were selected to investigate the integration of the pCAMhGHE T-DNA into the root cells' genome. Also, as the lines 17 and 18 were statistically equivalent and showed the highest hGH1 production, the elite line 18 was selected to investigate the transgenic hGH1 protein expression.

Integration of the hGH1 cDNA into the hairy root genome and expression of the hGH1

The genetic transformation of the selected hairy root lines with the pCAMhGHE T-DNA and the production of hGH1 were evidenced by PCR and western blot analyses, respectively (Figure. 4). The presence of the 820-bp PCR product after amplification of the hGH1 from the genomic DNA of four representative transformed lines (Figure 4A, lanes BRGHE#line), confirmed the integration of the pCAMhGHE T-DNA into the hairy root genome. Additionally, the western blot signals of the transgenic hGH1 protein purified from the TSP from the two independent cultures of the line BRGHE18, and of the ~50 kDa concentrated protein fraction (Figure 4B), were similar to the signal observed for the standard hGH1 protein (lane GHC). These results confirmed the presence of the transgenic hGH1 protein in the TSP extracts, and therefore the expression of the hGH1 cDNA in the hairy root cultures. It should be noticed that the signal for hGH1 was not observed in the western blot autoradiography for the TSP crude extract (lane CE in Figure 4B), possibly because of the small amount of hGH1 present in this sample (approx. 0.72 µg/mL). Therefore these results were consistent with those for the expression of GUSPlus (Figure 2), and confirm the integration and correct expression of the hGH1 cDNA in the hairy roots grown in flask cultures. From this and the above results, the line BRGHE18 was selected as the elite hairy root line to further investigate the production of hGH1 in bioreactor cultures.

Biomass accumulation and hGH1 production in bioreactor cultures

To evaluate the biomass accumulation and hGH1 production in the airlift bioreactor with mesh with respect to that in flask cultures, a sample of 4 g FW of the BRGHE18 line was inoculated into SH culture medium supplied with sucrose (30 g/L) and $(NH_4)_2SO_4$ 300 mg/L in both systems. As shown in figure 5, growth of hairy roots in the modified airlift bioreactor equipped with mesh and draft tube was favored by better anchoring and homogeneous distribution of the roots through the bioreactor by the presence of the mesh

(Figure 5B). The presence of the draft tube improved mixing and generated small root clumps that reduced the necrosis associated with oxygen limitation, in comparison to roots growing in the non-modified bioreactor (Figure 5A). On the other hand, in contrast to flask cultures, evaluation of the growth pattern in bioreactor by direct sampling of biomass was not possible because of the anchoring of the tissue to the mesh (Figure 5C). Hence, to assess the growth evolution of hairy roots in bioreactor, sucrose uptake was used as an indirect estimation of cell growth as a function of time, and only the initial and final biomass were determined (Figure 6). From the growth pattern in conical flasks (Figure 6), cultures showed a lag phase of 5-7 days, and reached the stationary phase after 24 days, when the residual sucrose in both flasks and bioreactor cultures reached values of 9 g/L and 6 g/L respectively. It was clear that the sucrose uptake pattern in flask cultures showed a lag phase similar to that observed for biomass accumulation, but in bioreactor a lag phase for sucrose uptake was barely defined. Instead, it was clear that during the 20 days after the inoculation, the sucrose uptake pattern was almost linear, suggesting that growth in bioreactor started immediately after inoculation; in flask cultures, once the exponential phase was reached the sucrose uptake pattern was similar to that in bioreactor. In fact, no significant difference ($p = 0.5$) was found between the specific growth rate ($\mu$) of both cultures, but after 24 days, the grow index (GI), the biomass accumulation, TSP content and the transgenic hGH1 production were higher in bioreactor than in flask cultures (Table 1). The biomass harvested was 45 g FW/L in conical flasks and 57 g FW/L in bioreactor. The hGH1 production was 5.1±0.42 µg/g DW for flask cultures, and 7.8±0.3 µg/g DW for bioreactor, indicating that the production of the transgenic hGH1 was not affected by the growth rate, but might be affected by the culture system.

Structural analysis of the transgenic hGH1 by MALDI-TOF peptide mass fingerprint

Since the structural integrity of recombinant proteins is a major concern for biotechnological products, and because the fidelity of hGH1 translation in hairy roots of broccoli is unknown, a MALDI-TOF peptide mass fingerprint (PMF) experiment was conducted to investigate the primary structure of the transgenic hGH1 from the biomass of the BRGHE18 line harvested from the bioreactor culture. The transgenic hGH1 protein was purified by tangential filtration, ion exchange and gel filtration, and then identified by western blot (Figure 4B). Samples of both the standard hGH1 and the transgenic hGH1 protein were in-gel digested with trypsin and analyzed by MALDI-TOF peptide mass fingerprint for identification and characterization (Figure 7). The mass spectrum of the transgenic hGH1 peptides (Figure 7B) showed recurrent signals analogous to most peptides observed in the mass spectrum from the standard hGH1 peptides (Figure 7A). The mass analysis of such signals, performed with the ProteinPilot Software, identified both samples as somatotropin. The sum of the trypsin digested peptides identified from the transgenic hGH1 corresponds to 28.79% of the hGH1 amino acid sequence regarding to the sequence reported in the SwissProt database (Table 2). Resulting from this MALDI-TOF experiment, 6 peptides present in the mass spectrum of the transgenic hGH1 (indicated by arrows in Figure 7) and 5 peptides from the standard hGH1 were unambiguously identified by the ProteinPilot Software as part of the primary structure of somatotropin. Combination of the amino acid sequence of the signals at 930.62 m/z and 979.59 m/z from the transgenic hGH1, composed the sequence FPTIPLSRLFDNAMLR, which is identical to the N-terminus sequence of the native mature hGH1 protein. In addition, the peptide detected at 1400.7 m/z in the MS spectrum of both transgenic and standard hGH1 indicates that

disulfide bonds do exist linked identically as the native human somatotropin.[23] Thus, these results support that hairy roots cultures in the modified bioreactor express and process the hGH1 protein properly at the primary structure level.

## Discussion

This work demonstrates that hairy root cultures of *Brassica oleracea* var. *italica* can be used as an expression system for production of human therapeutic proteins in a modified airlift with mesh bioreactor. Expression of transgenic proteins in plant cell tissue and organ cultures requires efficient transformation and biomass propagation protocols. Hairy roots of *Brassica oleracea* have been established by several methods.[19,36-38] However, induction of the root tissue has usually been performed by co-cultivation of explants from the target plant with the proper *Agrobacterium rhizogenes* strain, and then subsequent transfer to a root induction and proliferation medium.[39] Unlike such conventional protocols, in this work hairy roots were established from explants of infected plants already carrying hairy roots emerging from the *Agrobacterium rhizogenes* infected site (Figure 2). Keeping the emerging roots attached to the explants in the semisolid medium greatly improved their survival and proliferation rates, probably because the explant supplied nutrients to the emerging roots during their early growth in a similar way as the phloem transports solutes to the meristematic tissues and to distant organs,[40] because the presence of feeder cell layers during co-cultivation improves the percentage of transformation and expression of transgenic genes in explants infected with *Agrobacterium*.[19] Using this procedure, 90% of the infected plantlets developed adventitious roots when inoculated before the appearance of true leaves. After selection of the putative transgenic lines, the final transformation efficiency was 50%. This value is higher than the 30% transformation rate reported by Henzi et al.,[19] who studied some factors that influence the *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of broccoli and proposed an optimized method to induce broccoli hairy roots using additives and a feeder cell layer. From these results, it was concluded that the modifications introduced in this work to the general protocol for hairy roots production facilitated the establishment of true genetically homogenous lines, because they were originated from a single root; therefore, from a single transformation event. However, although the transformed root cultures presented the phenotype typical of hairy roots, only 12 of the 25 established cultures expressed both the resistance gene hptII and the reporter gene GUSPlus carried in the pCAMhGHE T-DNA. This observation suggests that 13 root lines (52%) might have been transformed only with the T-DNA from the Ri1855 plasmid, which is introduced into the cell genome randomly and is responsible for the hairy root phenotype.[7,39] Alternatively, low expression of the resistance and reporter genes may have occurred, with consequent failure to support growth in the presence of hygromycin. This reasoning might explain the variability observed for the TSP content (from 9 to 21 mg/g DW), which for roots usually oscillates between 1 to 20 mg/g dry weight,[40] and for the transgenic hGH1 production in flask cultures (Figure 3); some lines grew properly in hygromycin with suitable β-glucuronidase activity, but were unable to express significant amounts of hGH1, for instance lines 4 and 12. Similar variability has been reported for antibody production by several hairy root clones of *Nicotiana tabacum*,[9] and is a general phenomenon among lines expressing heterologous proteins in plant systems based on Agrobacterium transformation,[41] particularly due to the metabolic disturbance generated by the random position of the inserted T-DNA, differences in gene copy number, and gene

silencing.[7] It should be noted that this metabolic variability among clones is different from the inherent variability and heterogeneity associated with whole transgenic plants, and cell and tissue cultures in plant biotechnological systems,[4] and represents a real opportunity to screen for high-yielding elite hairy root lines to produce hGH1.

Several studies have demonstrated the feasibility of developing expression systems based on plant cell, tissue, and organ cultures as an alternative for production of therapeutic proteins in bioreactor; however only a few examples have been commercially developed, principally because the low product yields (10–200 mg/L), which can be attributed, in part, to the stability of the heterologous protein, and to the bioreactor system and operation.[1,2,3]

Although production of hGH1 described in this work is still in early stages, the hairy root system of broccoli successfully produces the hGH1 in flasks and a modified airlift bioreactor with mesh (Table 1). As previously reported, the inclusion of the mesh as an anchoring scaffold improved the biomass proliferation and distribution in the reactor, minimizing the necrosis associated with oxygen limitation, compared to roots growing in the non-modified bioreactors (Figure 5A).[42,43] Consequently, higher accumulation of biomass, TSP and hGH1 in the modified bioreactor system may be explained due to the better distribution of biomass and improved accessibility to nutrients, although further studies to improve global yields and productivity are needed.

Expression of hGH1 by hairy root cultures of broccoli has not been reported previously, and in the current study, production was comparable to that described for hairy root cultures of *Nicotiana tabacum*, an expression system in which typically the specific production of transgenic proteins ranges from 0.0026% to 4% of the TSP.[44.] However, production levels were lower than that reported for a hybrid system of somaclonal hairy roots of *Nicotiana benthamiana* (30-60 µg/g DW) using episomal expression vectors,[16] tobacco cell suspension cultures (0.7 mg/L),[45] maize seeds (5% TSP),[45] tobacco chloroplasts (7% TSP),[13] and rice cell suspension cultures (57 mg/L).[15] Similarly, production was lower than that reported for microbial and animal-based systems, such as *Escherichia coli* (25-100 mg/L),[46] *Bacillus subtilis* (17-70 mg/L),[47] *Pichia pastoris* (49-240 mg/L),[11,48] and Chinese hamster ovary (CHO) cells (4-75 mg/L).[49] Corresponding, the hGH1 specific productivity obtained for both flask cultures (213 ng hGH/g DW*day) and bioreactor cultures (325 ng hGH/g DW*day) was lower than that reported for other mammalian transgenic proteins; for example, antibodies have been produced by hairy root cultures of *Nicotiana tabacum* at a specific accumulation rate of 0.22-0.40 mg/g DW*day in both conical flasks and a 2-L sparged bioreactor, and by whole transgenic plants, in which production ranged from 50 ng/g DW/day to 20 mg/g DW/day.[9]

Thus, although protein expression levels in this work, as in other plant systems, still need to be improved, it should be considered that plant based systems offer advantages such as the utilization of defined culture medium, sustained production levels, and wider scaling processes than mammalian cell cultures.[1] Also, as mentioned previously, broccoli hairy roots have advantages over other plant expression systems.[20,21] For instance, transgenic broccoli plants can be regenerated from hairy roots efficiently, and they can accumulate high levels of protein, despite the content of heterologous protein observed in this work.

Although MALDI-TOF analysis of trypsin digested proteins generally yields 40% to 50% sequence coverage considering identified and non-identified peptides,[31] typically for peptide mass fingerprint a sequence coverage of 20-40% is sufficient for identification of a

protein.[33,35] Thus, the 28.79% of sequence coverage unambiguously identified as the transgenic hGH1, the presence of the FPTIPLSRLFDNAMLR N-terminus peptide, and the intensity of most of the MS signals for the trypsin digested peptides, provided reasonable evidence for identification of the transgenic hGH1. Also, hydrolitic cleavage has been reported to be an important factor leading to low yields of heterologous protein in plant cell culture systems.[4,44] However, in contrast to most of the above plant-based expresion systems producing hGH1,[13,15,45] in the present work fragments of hGH1 from proteolysis or chemical degradation were not detected. The tryptic peptides reported in the study from the transgenic hGH expressed in maize seeds[45] remained linked by a disulfide bond as observed in the native hGH. Furthermore, as reported in one study using transplastomic tobacco plants,[13] the tryptic digestion of the oxidized form of the hGH produced a disulfide bonded peptide (T20S-ST21), similar to that detected at 1400.76 m/z in this work, for both transgenic and standard hGH1 (Figure 7). Furthermore, the tryptic peptides containing free cysteine T6 (~600 m/z), T16 (~1190 m/z) and T20 (~2600 m/z) reported by Staub et al.[13] for the reduced form of hGH1, were negligible in the MALDI-TOF analysis of the transgenic hGH1 in this work. Therefore these results indicate that disulfide bonds do exist linked identically as in the native hGH. In relation to this, it should be noted that although DTT was included in the MALDI-TOF sample preparation protocol, the experimental conditions allowed DTT to act as a redox scavenger of free sulfide groups to prevent intramolecular and intermolecular reactions between peptides in the gel fragment, rather than to reduce disulfide bonds.

## Conclusions

The results in this work strongly suggest that the transgenic hGH1 produced by hairy root cultures of broccoli was in its correct, oxidized form; therefore, these cultures have the ability not only to express, but also to properly process and fold the transgenic hGH1 as the native mature corresponding protein and perhaps in its biologically active form. Thus, although biological activity of the transgenic hGH1 remains to be investigated, the results from this work suggest that the hairy roots of broccoli have potential as a real alternative expression system for production of hGH1, and possibly other similar therapeutic proteins.

## Acknowledgment

The first author was supported by a doctoral scholarship (207131) from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT México).

## Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

1. Huang TK, McDonald K. Molecular Farming Using Bioreactor-Based Plant Cell Suspension Cultures for Recombinant Protein Production. In: Wang A, Ma S, editors. Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects: Springer Netherlands. 2012: p 37-67.

2. Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV. Advances in plant molecular farming. Biotechnol Adv. 2011; 29: 210-222.

3. Fischer R, Schillberg S, Hellwig S, Twyman RM, Drossard J. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. Biotechnol Adv. 2012; 30: 434-439.

4. Wilson SA, Roberts SC. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. Plant Biotechnol J. 2012; 10: 249-268.

5. Wilken L, Nikolov Z. Downstream Processing of Transgenic Plant Systems: Protein Recovery and Purification Strategies. In: Wang A, Ma S, editors. Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects: Springer Netherlands. 2012: p 217-257.

6. Hu ZB, Du M. Hairy root and its application in plant genetic engineering. J Integr Plant Biol. 2006; 48: 121-127.

7. Tzfira T, Citovsky V. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Curr Opin Biotechnol. 2006; 17: 147-154.

8. Menassa R, Ahmad A, Joensuu J. Transient Expression Using Agroinfiltration and Its Applications in Molecular Farming. In: Wang A, Ma S, editors. Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects: Springer Netherlands. 2012: p 183-198.

9. Sharp JM, Doran PM. Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. Biotechnol Prog. 2001; 17: 979-992.

10. Twyman RM. Host Plants, Systems and Expression Strategies for Molecular Farming. Molecular Farming: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2005: p 191-216.

11. Ecamilla-Trevino LL, Viader-Salvado JM, Barrera-Saldana HA, Guerrero-Olazaran M. Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in Pichia pastoris. Biotechnol Lett. 2000; 22: 109-114.

12. Leite A, Kemper EL, da Silva MJ, Luchessi AD, Siloto RM, Bonaccorsi ED, El-Dorry HF, Arruda P. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. Mol Breed. 2000; 6: 47-53.

13. Staub JM, Garcia B, Graves J Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye GN, Russell DA. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. Nat Biotechnol. 2000; 18: 333-338.

14. Gils M, Kandzia R, Marillonnet S, Klimyuk V, Gleba Y. High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. Plant Biotechnol J. 2005; 3: 613-620.

15. Kim TG, Baek MY, Lee EK, Kwon TH, Yang MS. Expression of human growth hormone in transgenic rice cell suspension culture. Plant Cell Rep. 2008; 27: 885-891.

16. Skarjinskaia M, Karl J, Araujo A, Ruby K, Rabindran S, Streatfield SJ, Yusibov V. Production of recombinant proteins in clonal root cultures using episomal expression vectors. Biotechnol Bioeng. 2008; 100: 814-819.

17. Devos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human Growth-Hormone and Extracellular Domain of Its Receptor - Crystal-Structure of the Complex. Science. 1992; 255: 306-312.

18. Rogol AD, Clinical and humanistic aspects of growth hormone deficiency and growth-related disorders. Am J Manag Care. 2011, 17 Suppl 18: eS4-10.

19. Henzi MX, Christey MC, McNeil DL. Factors that influence *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). Plant Cell Rep. 2000; 19: 994-999.

20. Puddephat IJ, Robinson HT, Fenning TM, Barbara DJ, Morton A, Pink DA. Recovery of phenotypically normal transgenic plants of *Brassica oleracea* upon *Agrobacterium rhizogenes*-mediated co-transformation and selection of transformed hairy roots by GUS assay. Mol Breed. 2001; 7: 229-242.

21. Souci SW, Fachmann W, Kraut H, Kirchhoff E, Lebensmittelchemie DF. Food Composition and Nutrition Tables. MedPharm Scientific Publishers, 2008.

22. Costantino P, Hooykaas PJ, Dendulkras H, Schilperoort RA. Tumor-Formation and Rhizogenicity of *Agrobacterium rhizogenes* Carrying Ti-Plasmids. Gene. 1980; 11: 79-87.

23. Broothaerts W, Mitchell HJ, Weir B, Kaines S, Smith LM, Yang W, Mayer JE, Roa-Rodriguez C, Jefferson RA. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. Nature. 2005; 433: 629-633.

24. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Exp Cell Res. 1968; 50: 151-158.

25. Schenk RU, Hildebrandt AC. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant-Cell Cultures. Can J Bot. 1972; 50: 199-204.

26. Sundaresan V, Springer P, Volpe T, Haward S, Jones JD, Dean C, Ma H, Martienssen R. Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. Genes Dev. 1995; 9: 1797-1810.

27. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal Chem. 1956; 28: 350-356.

28. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254.

29. Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res. 1991; 19: 1349.

30. Kang, T. J.; Yang, M. S., Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. [Published online September 2, 2004] BMC Biotechnol. 2004;4:20. doi: 10.1186/1472-6750-4-20.

31. Jimenez CR, Huang L, Qiu Y, Burlingame AL. In-gel digestion of proteins for MALDI-MS fingerprint mapping. Curr Protoc Protein Sci. 2001, Chapter 16: Unit 16.4.

32. Huynh ML, Russell P, Walsh B. Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis. Methods Mol Biol. 2009; 519: 507-513.

33. Ye H, Hill J, Kauffman J, Han X. Qualitative and quantitative comparison of brand name and generic protein pharmaceuticals using isotope tags for relative and absolute quantification and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry. Anal Biochem. 2010; 400: 46-55.

34. Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90: 5011-5015.

35. Clauser KR, Hall SC, Smith DM, Webb JW, Andrews LE, Tran HM, Epstein LB, Burlingame AL. Rapid mass spectrometric peptide sequencing and mass matching for characterization of human melanoma proteins isolated by two-dimensional PAGE. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995, 92; 5072-5076.

36. Boulter ME, Croy E, Simpson P, Shields R, Croy RR, Shirsat AH. Transformation of Brassica napus L. (oilseed rape) using *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* — A comparison. Plant Sci. 1990; 70: 91-99.

37. Christey MC, Sinclair BK. Regeneration of transgenic kale (Brassica oleracea var. acephala), rape (B. napus) and turnip (B. campestris var. rapifera) plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. Plant Sci. 1992; 87: 161-169.

38. Christey MC, Sinclair BK, Braun RH, Wyke L. Regeneration of transgenic vegetable brassicas (*Brassica oleracea* and B. campestris) via Ri-mediated transformation. Plant Cell Rep. 1997; 16: 587-593.

39. Christey M, Braun R. Production of Hairy Root Cultures and Transgenic Plants by Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transformation. In: Peña, L., editor. Transgenic Plants: Methods and Protocols: Humana Press. 2004: p 47-60.

40. Bloom A. Mineral Nutrition. In: Taiz LZ, editor. Plant Physiol. Sunderland, MA: Sinauer Assoc. 2010: p 107-130.

41. Xu J, Kieliszewski MJ. A novel plant cell bioproduction platform for high-yield secretion of recombinant proteins. Methods Mol Biol. 2012; 824: 483-500.

42. Huang TK, McDonald KA. Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures. Biotechnol Adv. 2012; 30: 398-409.

43. Peraza-Luna F, Rodríguez-Mendiola M, Arias-Castro C, Bessiere JM, Calva-Calva G. Sotolone Production by Hairy Root Cultures of Trigonella foenum-graecum in Airlift with Mesh Bioreactors. J Agric Food Chem. 2001; 49: 6012-6019.

44. Doran PM. Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. Trends Biotechnol. 2006; 24: 426-432.

45. Russell DA, Spatola LA, Dian T, Paradkar VM, Dufield DR, Carroll JA, Schlittler MR. Host limits to accurate human growth hormone production in multiple plant systems. Biotechnol Bioeng. 2005; 91: 522-522.

46. Rezaei M, Zarkesh-Esfahani SH. Optimization of production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*. J Res Med Sci. 2012; 681-685.

47. Özdamar TH, Şentürk B, Yilmaz ÖD, Çalık G, Çelik E, Çalık P. Expression system for recombinant human growth hormone production from *Bacillus subtilis*. Biotechnol Prog. 2009; 25: 75-84.

48. Apte-Deshpande A, Rewanwar S, Kotwal P, Raiker VA, Padmanabhan S. Efficient expression and secretion of recombinant human growth hormone in the methylotrophic yeast Pichia pastoris: potential applications for other proteins. Biotechnol Appl Biochem. 2009; 54: 197-205.

49. Kunaparaju R, Liao M, Sunstrom NA. Epi-CHO, an episomal expression system for recombinant protein production in CHO cells. Biotechnol Bioeng. 2005; 91: 670-677.

Accepted Article

Accepted Article

Table 1. Growth parameters, sucrose uptake, and content of hGH1 protein in broccoli hairy root cultures in the modified airlift bioreactor and in conical flasks.

| Parameter | Modified Airlift reactor | Conical flasks |
|---|---|---|
| $X_{24}$ (g DW /L) | 4.6 | 3.2 |
| GI (Growth index) | 13.32 | 9.10 |
| $\mu$ ($d^{-1}$) | 0.11* | 0.13 |
| Td (d) | 6.25* | 5.18 |
| $\Delta S_{suc}$ (g/L) | 24 | 21 |
| $Y_{x/suc}$ (g DW/g) | 0.19 | 0.15 |
| TSP (mg/g DW) | 46.13±4.13 | 31.50±2.63 |
| hGH1/X (µg/g DW) | 7.8±0.3 | 5.1±0.44 |
| hGH1/V (µg/L) | 35.9±1.4 | 16.3±1.3 |
| $P_{hGH1/X}$ (µg/g DW/d) | 0.33±0.01 | 0.21±0.01 |
| $P_{hGH1/V}$ (µg/L/d) | 1.5±0.06 | 0.68±0.05 |

Cultures grown by 24 days as indicated in Fig 6. X, biomass; GI, (final biomass - initial biomass)/initial biomass; µ, specific growth rate; Td, duplication time; $\Delta S_{suc}$, sucrose uptake; $Y_{x/suc}$, growth yield from sucrose; TSP, total soluble protein; hGH1/X, hGH1 specific production; hGH1/V volumetric production; $P_{hGH1/X}$, hGH1 specific productivity; $P_{hGH1/V}$, hGH1 volumetric productivity. *Parameters estimated using the initial and final biomass values.

Table 2. Summary of the peptide mass fingerprint analysis for identification and characterization of the transgenic hGH1

Somatotropin sequence showing the identified peptides in bold. The sequence coverage was 28.79%

1: FPTIPLSRLF DNAMLRAHRL HQLAFDTYQE FEEAYIPKEQ KYSFLQNPQT SLCFSESIPT PSNREETQQK
71: SNLELLRISL LLIQSWLEPV QFLRSVFANS LVYGASDSNV YDLLKDLEEG IQTLMGRLED GSPRTGQIFK
141: QTYSKFDTNS HNDDALLKNY GLLYCFRKDM DKVETFLRIV QCRSVEGSCG F

| Protein digested | Protein matched with | Start-end in predicted protein sequence | Peptide Sequence | MALDI-TOF mass $MH^+$ (m/z) | Calculated mass $MH^+$ (m/z) |
|---|---|---|---|---|---|
| Standard hGH1 | Somatotropin | 9-16 | LFDNAMLR | 979.52 | 979.24 |
| | | 20-41 | LHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQK | 2727.47 | 2727.86 |
| | | 28-41 | QEFEEAYIPKEQK | 1637.88 | 1637.16 |
| | | 71-77 | SNLELLR | 844.50 | 844.94 |
| | | 169-179 | DMDKVETFLR | 1253.69 | 1253.08 |
| Transgenic hGH1 | Somatotropin | 1-8 | FPTIPLSR | 930.62 | 930.28 |
| | | 9-16 | LFDNAMLR | 979.59 | 979.61 |
| | | 20-41 | LHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQK | 2727.61 | 2727.86 |
| | | 28-41 | QEFEEAYIPKEQK | 1638.97 | 1639.12 |
| | | 71-77 | SNLELLR | 844.56 | 844.36 |
| | | 169-179 | DMDKVETFLR | 1253.73 | 1253.41 |

Sequences and masses of peptides detected and unambiguously identified in the standard and transgenic sample. The peptides listed were identified by the ProteinPilot Software search engine.

Accepted Article

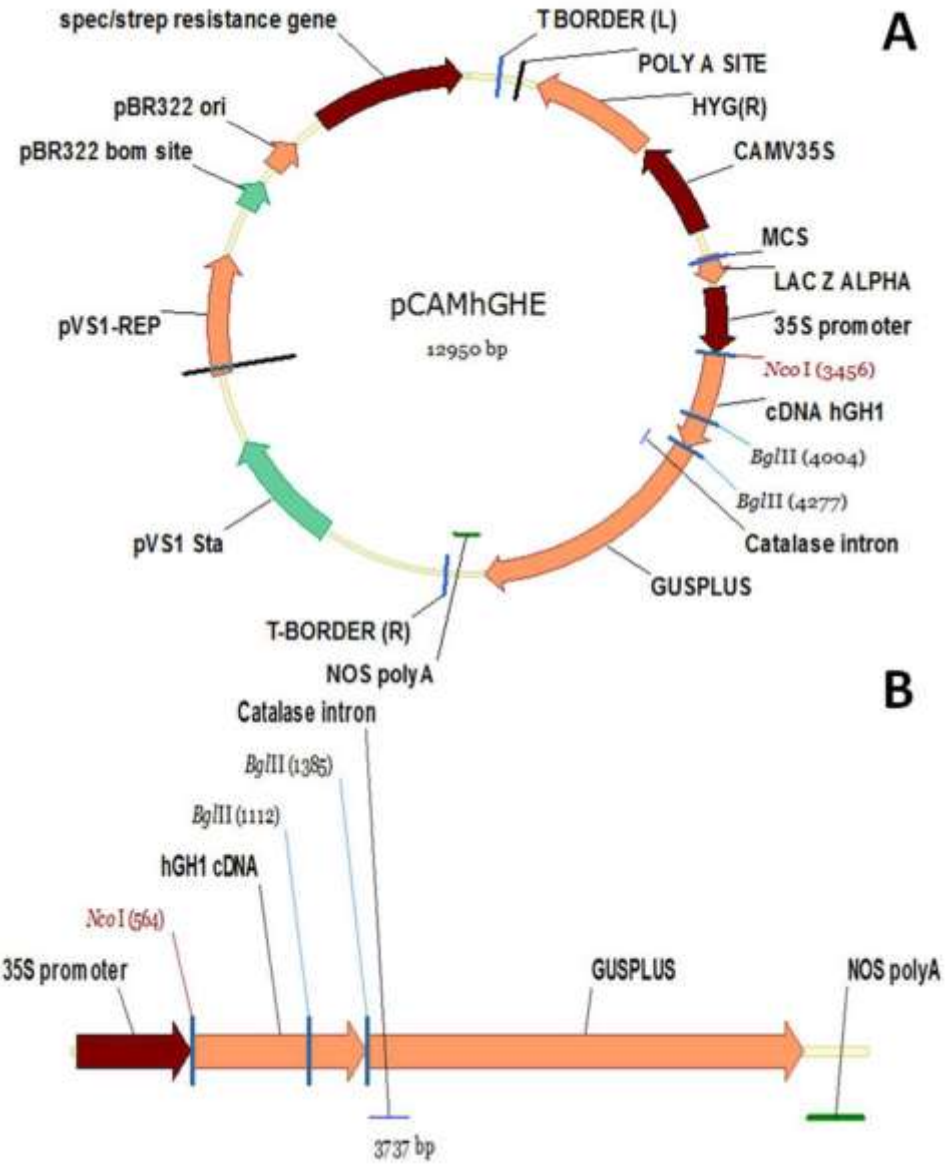


Figure 1. Map of the pCAMhGHE binary vector (A) that includes the TL and TR borders from the plasmid Ri limiting the T-DNA, and the expression cassette (B) contained in the T-DNA of the pCAMBIA1105.1 (without hGH1 cDNA) and pCAMhGHE (with hGH1 cDNA) binary vectors. The hGH1 cDNA was inserted into the T-DNA between the 35S cauliflower mosaic virus promoter and the GUSplus gene using the NcoI and BglII restriction sites. GUSPlus gene is interrupted by a catalase intron and flanked by the poly A signal from the nopaline synthetase gene.
243x305mm (72 x 72 DPI)

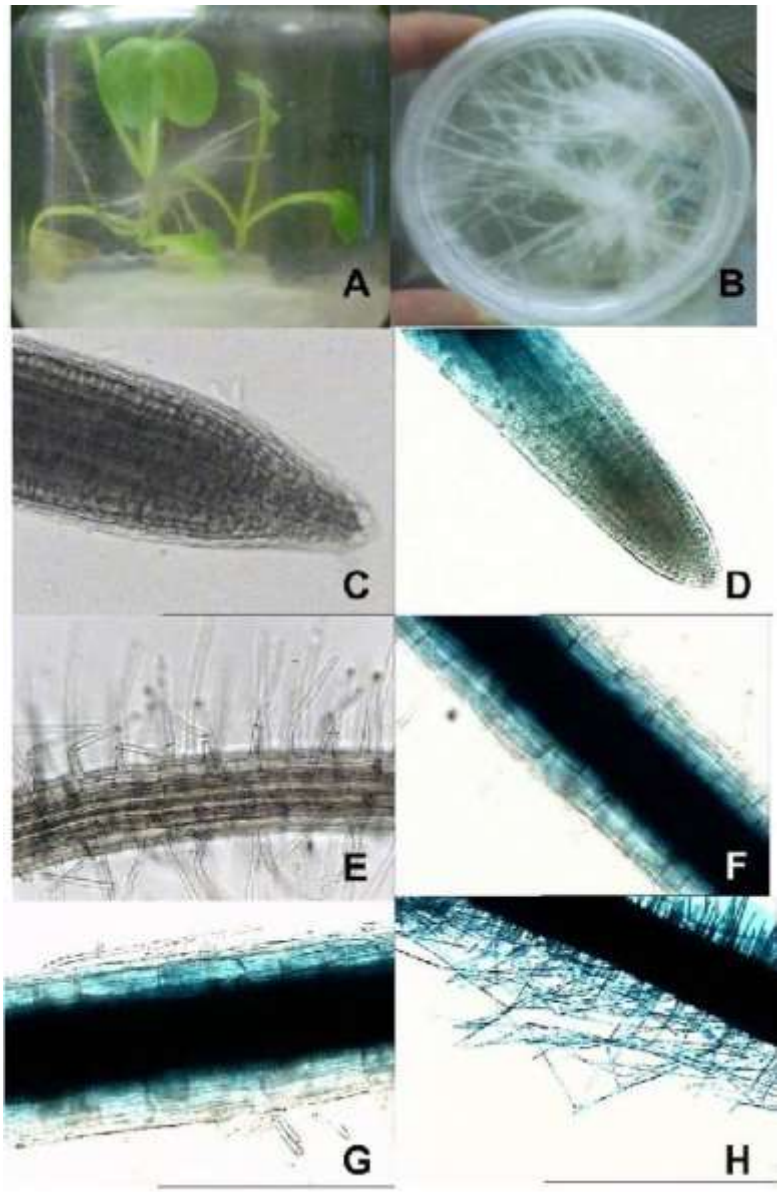


Figure 2. Induction, establishment, and β-glucuronidase histochemical assay of roots of broccoli. (A), Adventitious roots emerging from hypocotyl of plantlets 15 days after infection with A. rhizogenes; (B), hairy roots after 12 days of transference the hypocotyl explants to SH medium. (C-H), Optical microphotographs (40×) of roots analyzed for GUS activity of non-transformed roots (C); primary roots transformed with pCAMBIA1105.1 (D); primary roots transformed with the wild-type A. rhizogenes strain (E); and primary roots of three lines transformed with the pCAMhGHE T-DNA (F-H). Blue color indicates positive β-glucuronidase activity.
163x252mm (150 x 150 DPI)

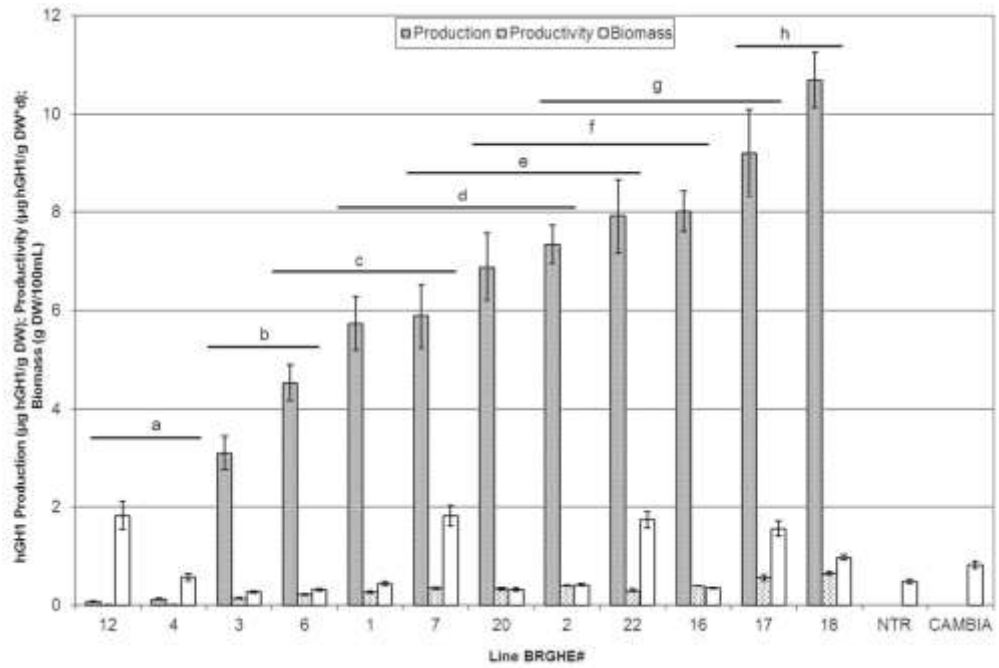


Figure 3. Production and productivity of hGH1 by 20 days old cultures of the 12 screened hairy roots lines of broccoli (numbers) positively-transformed with the pCAMhGHE T-DNA relative to their biomass accumulation and compared with non-transformed (NTR), and pCAMBIA1105.1 T-DNA transformed root cultures (CAMBIA). The hGH1 protein was quantified in the TSP crude extracts by ELISA. Different letters in the bars indicate groups of equivalent means of hGH1 production at significance of $p < 0.05$.
238x162mm (150 x 150 DPI)

Accepted

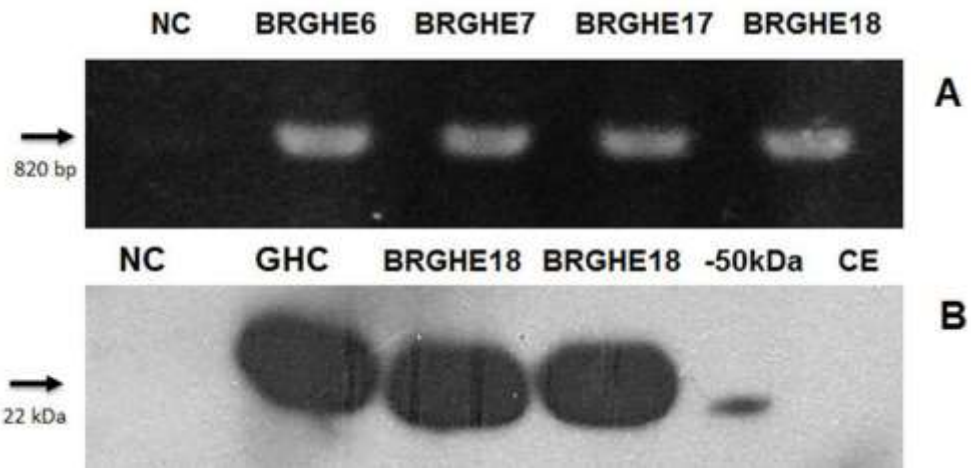


Figure 4. (A) PCR amplification of the hGH1 cDNA from the genomic DNA of four representative hairy root lines (820-bp amplicon) in comparison with the genomic DNA of non-transformed roots (NC, negative control). (B) Western blot analysis of hGH1 from two hairy root cultures of BRGHE18 in relation to the total soluble protein extract from non-transformed roots (NC, negative control). Lane GHC, standard hGH1 protein (0.5 µg); lanes BRGHE18, hGH1 purified from two independent hairy root cultures (0.5 µg); lane -50 kDa, tangential filtration fraction (<50 kDa) from a bioreactor culture of BRGHE18 (25 µg total protein with 40 ng hGH1); lane CE crude TSP (20 µg TSP with 0.0072 ng hGH1).
248x117mm (72 x 72 DPI)

Accepted

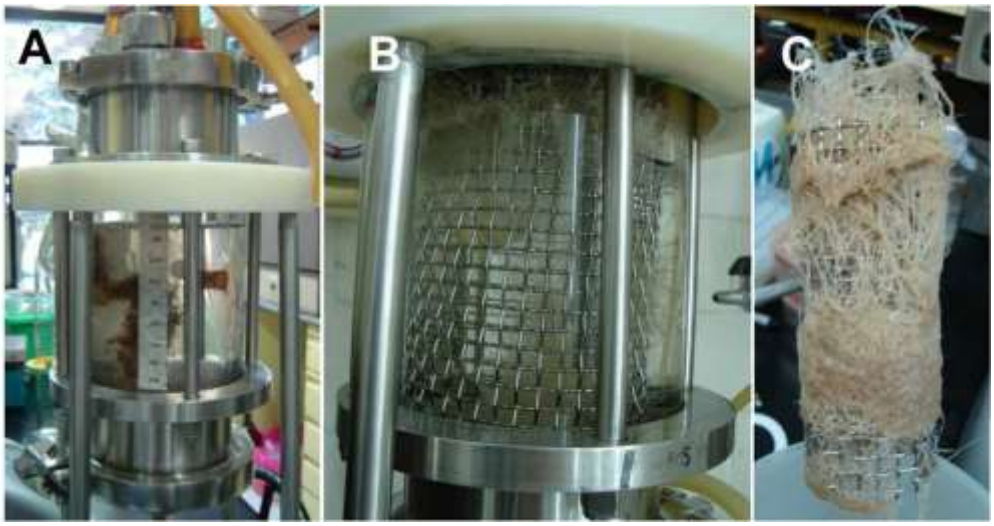


Figure 5. Hairy root cultures of broccoli after 24 days in the 1.5 L airlift bioreactor with draft tube (A), and after 7 days in the column-mesh-draft tube bioreactor (B) with SH medium supplemented with sucrose (30 g/L). (C) Harvest of broccoli hairy roots line BRGHE18 after 24 days of culture in the 1.5 L column-mesh-draft tube bioreactor. Transgenic hGH1 from this culture was analyzed by western blot and MALDI-TOF peptide mass fingerprint.
177x91mm (150 x 150 DPI)

Accepted

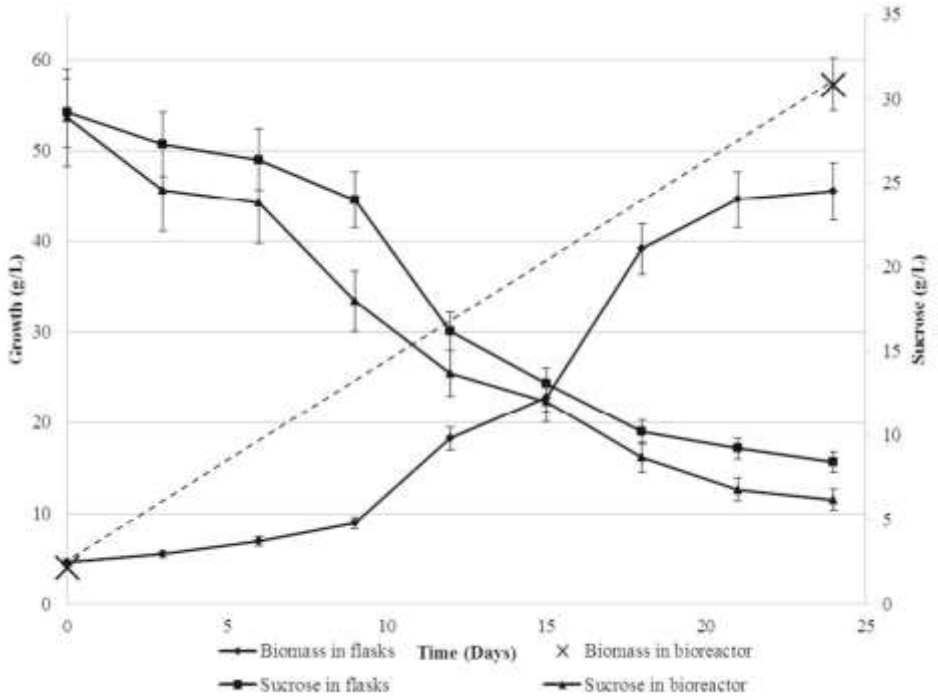


Figure 6. Time course of growth and sucrose uptake of hairy root cultures of broccoli in conical flasks, in comparison to the sucrose uptake and biomass production of hairy root cultures in the column-mesh-draft tube bioreactor. Both cultures were performed with SH medium supplemented with sucrose 30 g/L, 1.25x (NH4)2SO4, and 0.2 vvm air flow rate. The error bars represent the standard deviation of at least three determinations.
185x138mm (150 x 150 DPI)

Accep

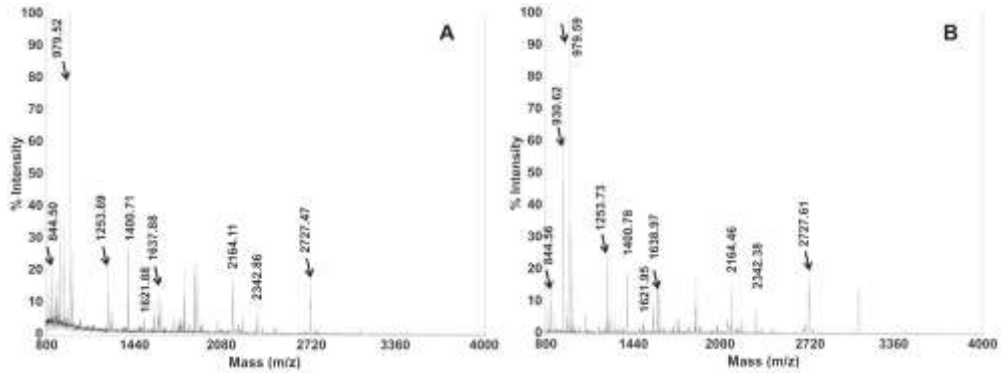


Figure 7. MALDI–TOF mass spectra of in gel-tryptic digestion of: A) the standard hGH1; and B) the transgenic hGH1 from the hairy root biomass of the BRGHE18 line harvested after 24 days of culture in the
1.5 L column-mesh-draft tube bioreactor. The analysis was performed in a 4800 plus MALDI TOF/TOF
Analyzer in the positive ion mode. Arrows indicate unambiguously identified peptides as part of the somatotropin primary structure, as showed in table 2.
330x121m
m (150 x
150 DPI)

Accepted