

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA  
DEPARTAMENT de BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
PROGRAMA DE DOCTORAT en BIOTECNOLOGIA  
BIENNI 2001-2003

***Producció d'un inhibidor del VIH-1  
en plantes de tabac i d'arròs***

Memòria presentada per Marc Castellet Llerena per optar al títol de doctor per la  
Universitat de Barcelona

el director de tesi

l'autor

el tutor

M<sup>a</sup>Dolors Ludevid Múgica

Marc Castellet Llerena

Albert Ferrer Prats

Barcelona, Juny de 2006

***Discussió***



## 1. L'expressió en plantes de tabac representa un sistema alternatiu de producció de T-20

En els últims anys les plantes s'han consolidat com un sistema alternatiu per a la producció de proteïnes d'interès terapèutic. La reducció en els costos de producció, la seguretat davant de possibles contaminacions per patògens humans i la seva capacitat de processament posttraduccional són alguns dels avantatges que ofereix aquesta emergent aplicació biotecnològica (Ma i col., 2003). En aquest treball s'ha desenvolupat un sistema per produir, en plantes, un pèptid terapèutic amb activitat antiviral que inhibeix l'entrada del VIH-1 a la cèl·lula diana: el T-20. Actualment el T-20 és produït per síntesi química mitjançant un complex procés format per més de 100 reaccions químiques que condicionen l'elevat cost del producte. Aquest fet, comporta que només una petita part dels pacients potencials pugui ser tractats amb aquest fàrmac. Així, per a ampliar la disponibilitat del T-20 hem cregut interessant explorar la possibilitat de produir-lo en un sistema recombinant que permeti abaratir costos.

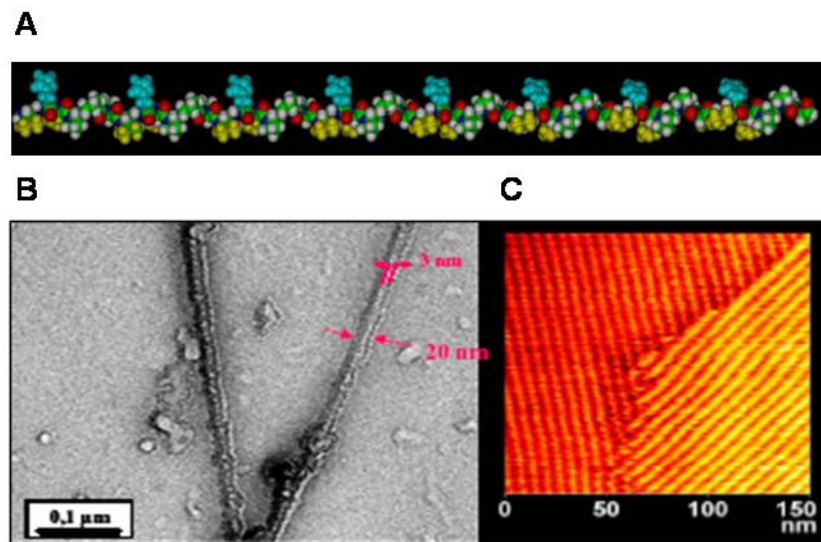
Com es demostra en aquest treball, l'expressió en plantes de tabac pot representar un sistema alternatiu per a la producció del T-20. S'ha demostrat que amb l'estratègia emprada es poden assolir nivells alts d'acumulació de T-20 en fulles de tabac (fins al 0,3 % de proteïna total soluble) i que és possible obtenir-lo amb un alt grau de puresa mitjançant un procés de purificació que permet ser escalat. A més, s'ha comprovat que el pèptid produït en plantes és actiu en cèl·lules en cultiu i que presenta la mateixa capacitat d'inhibició que el pèptid produït per síntesi química.

### 1.1. Acumulació de les proteïnes de fusió al RE

Un dels punts crítics per tal que un sistema de producció en plantes sigui viable és la necessitat d'assolir nivells alts d'acumulació de la proteïna recombinant. Diversos estudis han demostrat que el direccionament de la proteïna recombinant a la via de secreció i la seva retenció en el RE mitjançant el tetrapèptid K(H)DEL afavoreix la seva estabilitat i, consegüentment, el seu grau d'acumulació (Wandelt i col., 1992; Conrad i col., 1998, Chen i col., 2006). Tanmateix, aquesta estratègia presenta certs inconvenients quan el que es vol produir són pèptids o proteïnes d'aplicació terapèutica. Potser l'inconvenient més evident és que l'acumulació de proteïnes al RE via H/KDEL és dependent del receptor i per tant, saturable. Les proteïnes solubles amb una extensió C-terminal H/ KDEL surten del RE en vesícules tipus COPII (Phillipson i col., 2001) i una vegada en el Golgi són capturades per ERD2 (receptor del H/KDEL) per a ser reciclades altre cop al RE en vesícules tipus COPI (Boevink i col., 1998). D'altre banda, la incorporació del tetrapèptid H/KDEL a la seqüència aminoacídica del fàrmac pot condicionar la seva activitat. En aquest treball, s'han evitat aquests problemes emprant una estratègia d'acumulació al RE independent de K(H)DEL. S'ha expressat el T-20 fusionat a dominis rics en prolina de  $\gamma$ -zeïna aprofitant les propietats

d'aquests dominis per quedar retinguts en el RE (Geli i col., 1994). D'aquesta manera s'ha aconseguit acumular T-20 de forma estable dins d'aquest compartiment cel·lular.

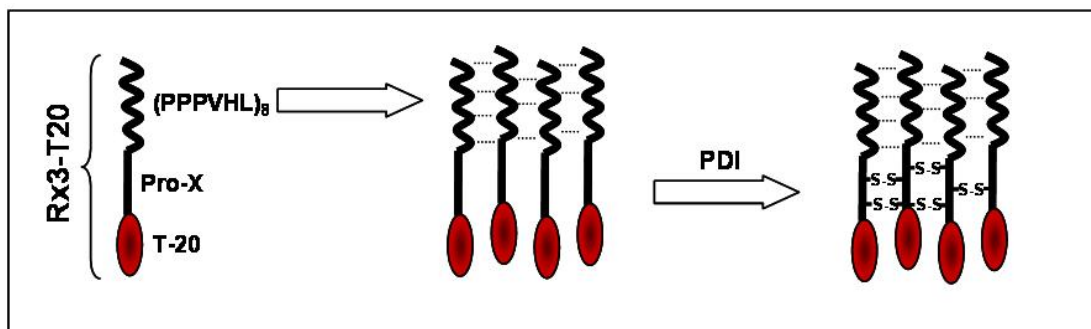
La retenció al RE provocada pels dominis rics en prolina de la  $\gamma$ -zeïna sembla estar relacionada amb la seva capacitat per agregar-se en aquest compartiment. Existeixen dos factors que podrien intervenir en aquest procés: la capacitat d'autoensemblatge del domini repetitiu i la formació de ponts disulfur intermoleculars. El domini repetitiu de la  $\gamma$ -zeïna està format per 8 repeticions de l'heptapeptid PPPVHL. Estudis de diroïsm circular i RMN realitzats amb un pèptid sintètic amb la mateixa seqüència van demostrar que aquest adoptava una conformació d'hèlix de proliprolina-II en una solució aquosa (Dalcol i col., 1996). En la figura 57A es representa aquesta estructura en què els residus hidrofòbics (valina, leucina) es situen en un costat i els residus polars (histidines) a l'altre. Posteriorment es va comprovar que la conformació d'hèlix de proliprolina-II proporcionava al pèptid (PPPVHL)<sub>8</sub> la capacitat d'autoensamblar-se formant unes estructures miceliars (Kogan i col., 2001; Kogan i col., 2002). Quan es dipositava el pèptid sobre grafit pirolític altament orientat (HOPG) es podia observar per microscòpia de força atòmica que la superfície quedava completament coberta de fibres de 6 nm alineades una al costat de l'altra (Fig. 56 C). En un ambient aquós el pèptid també tenia aquesta propietat i s'agregava formant unes fibres visibles al microscopi electrònic de transmissió (Fig.56 B). Així doncs, aquesta capacitat d'autoensemblatge podria explicar la retenció al RE de proteïnes de fusió que contenen el domini repetitiu. A més, s'ha demostrat que aquest domini té la propietat d'interaccionar amb lípids de la membrana de liposomes (Kogan i col., 2004), suggerint que l'agregació *in vivo* pot tenir lloc en la membrana interna del RE.



**Figura 57. Capacitat d'autoensemblatge del domini repetitiu de la  $\gamma$ -zeïna.** (A) Conformació en hèlix de proliprolina-II del pèptid (PPPVHL)<sub>8</sub>. Les cadenes hidrofòbiques de les leucines i valines es marquen en groc, les cadenes polars de les histidines en blau. (B) Imatge de microscòpia electrònica de transmissió de la disposició del pèptid en una solució aquosa. (C) Imatge de microscòpia de força atòmica de la disposició del pèptid sobre una superfície pirolítica de grafit.

D'altra banda, en el transcurs d'aquest treball s'ha vist que per solubilitzar les proteïnes de fusió era necessari l'addició d'un agent reductor en el tampó d'extracció. Aquest fet s'explica per la presència de 6 cisteïnes en els dominis rics en prolina, majoritàriament situades en el domini Pro-X (Fig.17), que podrien formar ponts disulfur intermoleculars i que contribuirien a l'agregació de les proteïnes de fusió dins el RE.

Així doncs, sembla que en la regió N-terminal de la  $\gamma$ -zeïna existeix una informació redundat que facilita el seu autoensamblatge en el RE: la conformació del domini repetitiu i la presència de cisteïnes. La nostra hipòtesis és que aquests dos mecanismes intervindrien seqüencialment en l'agregació dins el RE de proteïnes amb la regió N-terminal de la  $\gamma$ -zeïna (pe. Rx3-T20). En una primera etapa, la proteïna s'autoensamblaria gràcies a les interaccions hidrofòbiques entre dominis repetitius de diferents molècules i, a continuació, es formarien ponts disulfur, fent que les proteïnes quedessin unides covalentment. En la figura següent s'esquematitza aquest model.



**Figura 58. Mecanisme d'agregació proposat per a la proteïna de fusió Rx3-T20 en el RE.** En aquest model, les interaccions hidrofòbiques entre diferents dominis repetitius permetrien a la fusió autoensamblar-se afavorint l'acció de la disulfur isomerasa (PDI) que uniria les molècules covalentment.

Aquesta capacitat d'agregació junt amb les característiques del RE poden explicar l'alta acumulació de Rx3-T20 dins aquest compartiment. Les proteïnes, tant endògenes com heteròlogues, que són sintetitzades en el RE estan sotmeses a un mecanisme de control de qualitat per part del conjunt de xaperones i enzims del RE, principalment BiP, calnexina, calreticulina, GRP94, PDI i ERp57 (Ellgaard i col., 2003; Kleizen i col., 2004). En el moment en què una proteïna és sintetitzada i translocada al RE, aquestes xaperones s'uneixen a la proteïna per facilitar el seu plegament. Si obté la conformació adequada, les xaperones es separen permetent-li que continuï per la via de secreció. Per contra, si la proteïna no aconsegueix la conformació correcta, les xaperones resten unides i dirigeixen la proteïna cap a la via ERAD perquè sigui translocada al citosol i degradada pel proteasoma (Ahner i col., 2004). Recentment s'ha descrit que la xaperona luminal BiP també pot dirigir la proteïna mal plegada cap a vacuoles lítiques via Golgi (Pimpl i col., 2006). Aquest mecanisme podria representar

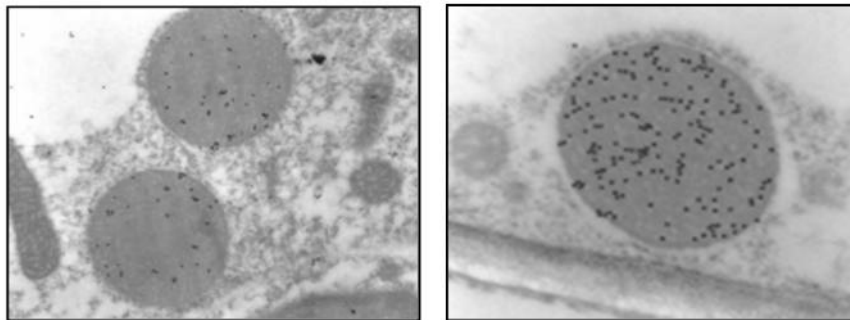
una alternativa a la degradació pel proteasoma per a aquelles proteïnes que no poden ser translocades al citosol.

Segons el nostre parer la capacitat d'agregació dels dominis rics en prolina podria impedir que la proteïna de fusió seguís aquestes vies provocant que restés acumulada de forma estable en el RE. D'una banda, els agregats de proteïna de fusió no podrien ser transportats al Golgi degut a la limitació de mida de partícula dels llocs de sortida del RE. Encara que s'ha vist que virus de 50 nm de diàmetre i fibres de col·lagen de 300 nm de longitud poden sortir del RE (Mackenzie i col., 2001; Mironov i col., 2001), podria ser que els agregats de proteïna de fusió presentessin una mida més gran, que impedis la seva sortida. A més, la capacitat d'interacció amb lípids de membrana del domini repetitiu també podria intervenir en aquest procés, retenint els agregats en la membrana interna del RE (Kogan i col., 2004). D'altra banda, la formació d'agregats també impediria que la proteïna de fusió fos degradada mitjançant la via ERAD en el cas que fos reconeguda com a anòmala o mal plegada. De fet, la presència de BiP en la fracció cel·lular on es localitza Rx3-T20 ens suggereix que aquesta xaperona està interactuant amb la proteïna quimèrica. Malgrat això, l'agregació de Rx3-T20 segurament no permet a BiP transferir la proteïna al translocó perquè sigui degradada en el citoplasma pel proteasoma ni formar vesícules COPII per degradar la proteïna en vacuoles lítiques. Així doncs, l'alta acumulació de Rx3-T20 en el RE es pot explicar amb la baixa mobilitat dels agregats dins aquest compartiment, impedint tant la sortida cap a l'aparell de Golgi com la seva translocació al citosol. D'aquesta manera resta estable en el RE permetent un alt grau d'acumulació.

Encara que la proteïna de fusió Rx3-T20 ha resultat ser la que permetia acumular més T-20 en fulles de tabac, l'expressió de les fusions R3-T20, P4-T20 i X10-T20 ens ha aportat informació sobre la capacitat dels diferents dominis de  $\gamma$ -zeïna per agregar-se dins el RE. Els resultats de *Western Blot* han mostrat que les quatre proteïnes de fusió presenten un diferent grau d'acumulació quan són expressades en fulla de tabac. El nivell màxim d'acumulació s'ha obtingut amb la proteïna Rx3-T20, seguida de R3-T20, P4-T20 i X10-T20 en aquest ordre. Si tenim en compte que aquestes diferències no són degudes a variacions en el nivell d'expressió ni estabilitat del missatge, segurament es poden atribuir a la capacitat de cada proteïna per agregar-se i quedar retinguda en el RE evitant la seva sortida. Així, en la fusió Rx3-T20 el domini repetitiu i les cisteïnes del domini Pro-X actuarien de forma sinèrgica, conferint-li la major capacitat per agregar-se i, consegüentment, la major acumulació. El mecanisme d'autoensemblatge del domini repetitiu sembla ser més eficient que la unió covalent per via del domini Pro-X, fet que es veu reflectit en la major acumulació de R3-T20 respecte a X10-T20. D'altra banda, l'expressió de la proteïna de fusió P4-T20 demostra la influència en l'agregació del domini repetitiu, ja que un única repetició PPPVHL millora sensiblement la seva acumulació respecte a X10-T20. Tot i així, ni el domini Pro-X ni el domini repetitiu semblen ser imprescindibles per provocar l'agregació dins el RE formant estructures denses, ja que totes les proteïnes de fusió s'han localitzat en la fracció corresponent a CP en els experiments de fraccionament subcel·lular.

## 1.2. Localització subcel·lular de la proteïna de fusió Rx3-T20

Els experiments de localització subcel·lular de la proteïna Rx3-T20 realitzats no permeten determinar exactament en quin compartiment subcel·lular s'acumula aquesta proteïna. Malgrat això, existeixen diversos indicis que suggereixen que Rx3-T20 és capaç de formar CP derivats de RE. En primer lloc, el fraccionament subcel·lular de fulles de tabac transgènic ha mostrat que Rx3-T20 s'acumula en una fracció densa en la que també sedimenten els CP naturals de llavor. A més, aquesta fracció es troba enriquida en la xaperona del reticle BiP suggerint que els orgànuls on és localitzada Rx3-T20 estan relacionats amb el RE. En segon lloc, els experiments preliminars d'immunolocalització al microscopi confocal ens indiquen que Rx3-T20 s'acumula en unes estructures que podrien correspondre per mida, distribució i forma a CP. Per últim, existeixen diversos precedents que demostren la capacitat de formació de CP de proteïnes de fusió que contenen dominis rics en prolina de la  $\gamma$ -zeïna. En el laboratori s'havia vist que la fusió d'aquests dominis a l'hormona calcitonina era capaç de formar CP en fulles de tabac. Recentment, estudis realitzats per Mainieri i col. (2004) confirmen aquesta capacitat a l'observar que la fusió en C-terminal d'aquests dominis a la proteïna vacuolar de reserva de mongeta faseolina també provoca una alta acumulació de la proteïna de fusió en CP quan és expressada en fulles de tabac (Fig.59).



**Figura 59. Cossos proteics de zeolina.** Micrografies electròniques de cossos proteics formats per l'expressió constitutiva en plantes de tabac de la faseolina fusionada a la regió N-terminal de la  $\gamma$ -zeïna (Zeolina). (Mainieri i col., 2004).

Així doncs, encara que seria necessari immunolocalitzar la proteïna al microscopi electrònic, tot apunta que Rx3-T20 és capaç de quedar retinguda al RE i formar CP. La capacitat de retenció al RE dels dominis rics en prolina de la  $\gamma$ -zeïna ja havia estat descrita anteriorment per Geli i col. (1994) mitjançant l'expressió de mutants de delecció en *Arabidopsis*. En aquest treball també es postulava que la regió C-terminal de la  $\gamma$ -zeïna semblava ser essencial per a la formació de CP. Amb els resultats obtinguts s'ha pogut ampliar la primera conclusió formulada per Geli i col.: els dominis N-terminal rics en prolina poden conferir la seva capacitat de retenció al RE a una proteïna fusionada en C-terminal. D'altra banda, l'habilitat d'acumular-se en orgànuls densos, probablement CP, no és un resultat esperat en la segona conclusió.



### 1.3. Rx3-T20 és estable a la dessecació de la fulla de tabac

Un dels inconvenients d'utilitzar les fulles de tabac com a teixit de producció és que la proteïna d'interès és expressada en un ambient aquós que afecta seriosament la seva estabilitat (Menkhaus i col., 2004). En la majoria de casos és necessari congelar o processar l'elevada biomassa vegetal generada immediatament després de la seva recollida per tal que la proteïna recombinant no es degradi. Com s'ha demostrat en aquest treball, l'agregació de la proteïna de fusió Rx3-T20 dins el RE permet assecat la fulla sense que es produeixi una pèrdua de proteïna recombinant. D'aquesta manera es pot emmagatzemar el material assecat a temperatura ambient fins al moment de la purificació del producte, abaratint substancialment el procés de producció. L'estabilitat de Rx3-T20 també beneficia la purificació, ja que la majoria de proteïnes de la fulla de tabac són degradades durant l'assecat fent augmentar el contingut relatiu de Rx3-T20 en fulles seques.

Un cas excepcional és la línia Rxt3.31, on Rx3-T20 no només és estable sinó que el seu grau d'acumulació es veu substancialment incrementat durant el procés de dessecació. Degut a que aquest fenomen té lloc en totes les plantes d'una única línia transgènica, creiem que deu ser provocat per l'efecte posicional del transgèn. Segurament la integració del T-DNA s'ha produït a prop d'elements que s'activen fortament en l'assecat de la fulla. Com s'ha demostrat en els experiments d'ELISA, amb aquest fenomen el contingut de Rx3-T20 ha passat de representar el 0,3% respecte al total de proteïnes solubles en fulla fresca de la línia Rxt3.31, a representar el 10% en fulla seca. S'ha produït doncs un increment de 30 vegades en el contingut relatiu de Rx3-T20, fent que els nivells d'acumulació en fulla seca siguin comparables amb els alts nivells obtinguts amb altres tecnologies com la transformació plasídica o l'expressió amb vectors virals (Staub i col., 2000; Gleba i col., 2005). Tanmateix, per poder aprofitar aquesta característica en un futur és necessari conèixer el mecanisme pel qual es produeix l'increment d'expressió durant l'assecat.

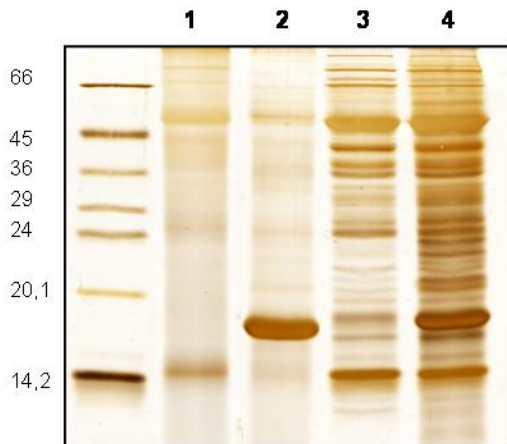
Actualment, gràcies a experiments de PCR inversa realitzats en el laboratori, existeixen indicis que la integració del T-DNA en el genoma s'ha produït en una seqüència que presenta una alta homologia amb la regió 5' del gen de la treonina desaminasa (TD) de *Nicotiana attenuata*. S'ha descrit que l'expressió d'aquest gen s'activa en resposta a l'atac de lepidòpters, en concret degut a ferida mecànica (Schittko i col., 2001). Per tant, encara que aquests resultats estan per confirmar, sembla que l'increment d'expressió de Rx3-T20 durant l'assecat podria ser conseqüència de les ferides infligides a les fulles de tabac en la seva recollida i no a la pròpia dessecació. Així doncs, aquests indicis obren una nova via d'investigació amb la finalitat de clonar i caracteritzar aquest promotor i poder utilitzar-lo en un futur per a l'expressió de proteïnes recombinants en tabac.

#### 1.4. Purificació de T-20 a partir de fulles de tabac

Diversos estudis demostren que el processament del material vegetal i la purificació de la proteïna expressada representen la major part dels costos en un sistema de producció en plantes (Menkhaus i col., 2004). Un exemple n'és la producció de  $\beta$ -glucuronidasa en plantes transgèniques de blat de moro, on s'ha estimat que el 94% dels costos de producció anuals són deguts al fraccionament de les llavors (6%), extracció de proteïna (40%) i purificació (48%) (Evangelista i col., 1998). Per tant, per tal que el sistema sigui comercialment viable és especialment important dissenyar un procés de purificació que no generi costos elevats. A més, els mètodes de purificació que s'utilitzin han de poder ser escalats i han de preservar la funcionalitat de la proteïna d'interès.

En aquest treball hem desenvolupat un protocol de purificació de T-20 a partir de fulles de tabac que compleix aquests requisits. En primer lloc s'han aprofitat les característiques físico-químiques de la proteïna de fusió Rx3-T20 per purificar-la mitjançant precipitació salina i cromatografia de bescanvi iònic. A continuació s'ha digerit la fusió amb la proteasa Factor Xa i s'ha purificat el T-20 per HPLC semipreparatiu. Com a resultat s'ha obtingut el pèptid T-20 amb un grau de puresa superior al 90%, que ens ha permès avaluar la seva activitat antiviral en un sistema de cèl·lules en cultiu.

Encara que el contingut en proteïna de fusió Rx3-T20 era molt elevat en fulla seca de la línia transgènica Rxt3.31 (10% de PTS), hi ha hagut un factor extern que ha dificultat enormement el procés de purificació: la contaminació accidental de les línies transgèniques amb el virus del mosaic del tabac (TMV). A la figura 60 es pot veure com en extractes proteics de fulla seca i fresca infectada amb TMV trobem una proteïna majoritària que correspon a la proteïna de la càpside del virus i que presenta la mateixa mobilitat electroforètica que Rx3-T20. Per tal de separar aquesta proteïna contaminant de Rx3-T20 ha estat necessari afegir etapes addicionals en el procés de purificació. Aquestes han consistit en: (1) realitzar preextraccions amb un tampó sense agent reductor per solubilitzar la proteïna de càpside del virus sense extreure Rx3-T20, i (2) afegir sulfat d'amoni al 10% en saturació a l'extracte per provocar la precipitació de la proteïna vírica. Tot i així, degut a l'abundància d'aquesta proteïna no s'ha pogut eliminar totalment fins a la purificació per HPLC, provocant una davallada en l'eficiència de cada etapa de purificació.



**Figura 60. Contaminació de les línies transgèniques amb TMV.** Extractes proteics (TrisHCl pH8 50mM, DTT 200mM) de fulles de tabac wt fresques (3 i 4) i seques (1 i 2) resolts per SDS-PAGE i impregnació amb nitrat de plata. Els extractes 2 i 4 provenen de plantes infectades amb TMV. Com es pot apreciar, la proteïna de la càpsida del virus és majoritària en aquests extractes. Valors dels pesos moleculars del marcador expressats en kD.

Tot i que l'estratègia d'expressar de T-20 en fusió amb dominis rics en prolina afavoreix l'acumulació del pèptid, comporta incorporar una etapa addicional en la purificació: el processament de la proteïna de fusió. En el nostre cas, s'ha introduït una diana de digestió per a la proteasa Factor Xa per poder alliberar el T-20. Encara que s'ha demostrat que aquest sistema és efectiu, l'elevat cost de l'enzim provoca un encariment notable en els costos de purificació. Una opció per evitar la utilització d'enzims és realitzar un processament químic de la proteïna de fusió amb bromur de cianogen (CnBr) (Rais-Beghdadi i col., 1998). El CnBr talla les metionines convertint-les en homoserina lactona, deixant un grup amino en N-terminal. Conseqüentment, per tal d'utilitzar aquest tipus de processament és necessari incorporar una metionina entre les dues parts de la proteïna de fusió. Aquest sistema, però, es veu limitat per la presència de metionines en la seqüència de la proteïna d'interès. Una altra alternativa és la incorporació d'una seqüència d'autoprocessament, tipus inteïna, a la proteïna de fusió (Senejani i col., 2001). Recentment s'han generat per enginyeria genètica seqüències d'intèina, en què el processament es pot induir mitjançant l'addició d'un agent nucleofílic com el DTT (Morassutti i col., 2002). D'aquesta manera es pot purificar la fusió i provocar el seu processament *in vitro*.

Encara que en aquest treball s'ha emprat un procés de purificació de Rx3-T20 basat en les seves característiques físico-químiques, l'agregació de Rx3-T20 dins el RE possibilita l'aplicació d'un sistema alternatiu de purificació. L'elevada densitat dels agregats de RX3-T20, permet que puguin ser aïllats mitjançant la centrifugació d'homogenats cel·lulars en un gradient de densitat. D'aquesta manera, amb un únic pas de purificació, es pot obtenir la proteïna de fusió Rx3-T20 pràcticament pura. Recentment s'ha desenvolupat altres estratègies d'expressió que permeten aprofitar els avantatges que ofereix l'acumulació de la proteïna recombinant en determinats orgànuls cel·lulars. SemBioSys Genetics ha desenvolupat un tecnologia en la qual la proteïna d'interès és expressada en fusió amb la oleosina (Seon i col., 2002). D'aquesta manera, la proteïna de fusió es pot recuperar de cossos oleics amb un simple procés d'extracció. Una altra estratègia és la fusió amb un domini transmembrana del receptor de cèl·lules T humanes (Schillberg i col., 2000). En aquest cas la proteïna de fusió es localitza a la membrana plasmàtica i pot ser extreta en un volum petit utilitzant detergents.

### 1.5. Activitat antiviral del T-20 purificat de plantes

L'activitat del T-20 purificat de plantes (pT20) s'ha avaluat *in vitro* en un sistema format per cèl·lules humanes MT4 infectades amb VIH-1 i s'ha comparat la seva capacitat d'inhibició amb la d'un pèptid produït per síntesi química (sT-20). Els resultats obtinguts mostren que el pT-20 inhibeix la mort cel·lular a una CE50 de 2,2 µg/mL, similar a la que s'obté amb el sT-20 (3,6 µg/mL). Per tant, a part de demostrar que el T-20 de plantes és actiu en un sistema *in vitro*, podem dir que la producció en plantes no representa cap disminució en l'activitat del fàrmac respecte a la seva síntesi química.

Tot i això, assaigs d'activitat realitzats amb el fàrmac comercial (cT-20) revelen que el seu grau d'inhibició és 10 vegades superior al pT-20 (CE50 = 0,2 µg/mL) (Esté i col., no publicat). Aquesta diferència es pot explicar gràcies a la modificació dels extrems del pèptid comercial. Tant el pT-20 com el sT-20 presenten els seus extrems amino- i carboxi-terminal lliures a diferència del comercial, en què l'extrem amino terminal es troba acetilat i l'extrem carboxi terminal amidat (Taula 6). Aquestes modificacions protegeixen segurament el pèptid de l'acció d'exopeptidases, fent augmentar la vida mitjana del compost en sistemes vius (Adessi i col., 2002).

Compost	N-terminal	C-terminal
pT-20	NH <sub>2</sub> -	-COOH
sT-20	NH <sub>2</sub> -	-COOH
cT-20 (Fuzeon)	AcNH-	-COONH <sub>2</sub>

**Taula 6. El T-20 comercial presenta modificacions en els seus extrems N- i C-terminal.**

Així doncs, encara que el pT-20 és actiu, el seu nivell d'inhibició es veu reduït degut a la forma lliure dels seus extrems. Encara que l'acetilació de l'extrem N-terminal és inviable en un sistema d'expressió recombinant, existeix una opció per obtenir en plantes T-20 amidat en C-terminal. Es podria expressar el pèptid amb una glicina en el seu extrem C-terminal i, mitjançant l'acció de l'enzim PAM (monooxigenasa amidant de peptidil-glicines), amidar-lo *in vitro* una vegada purificat (Ray i col., 1993). Per contra, la utilització de PAM recombinant en la purificació implicaria un increment substancial dels costos de producció.

## **2. Acumulació de T-20 en gra d'arròs**

Un dels objectius d'aquesta tesi ha estat l'acumulació de T-20 en grans d'arròs, ja que ofereix diversos avantatges respecte a l'acumulació en teixits vegetatius (Stoger i col., 2005). Les llavors de cereals aporten un entorn especialitzat en el emmagatzematge de proteïnes de reserva, fet que afavoreix l'acumulació i l'estabilitat de la proteïna recombinant. S'ha demostrat que anticossos expressats en llavor resten estables fins a tres anys a temperatura ambient sense que es produeixi una disminució detectable d'activitat (Stoger i col., 2000). A més, l'expressió en llavors facilita la purificació de la proteïna recombinant degut al simple proteoma d'aquest teixit de reserva i a l'absència de compostos fenòlics i alcaloides presents en teixits verds. Per últim, amb l'expressió específica en llavors s'evita el contacte de la proteïna recombinant amb herbívors i les possibles interferències amb el creixement i desenvolupament de la planta degudes a l'expressió de la proteïna en teixits vegetatius.

Amb la finalitat d'aprofitar aquests avantatges, s'ha expressat la proteïna de fusió Rx3-T20 en grans d'arròs utilitzant un promotor específic d'endosperma. S'ha escollit l'arròs com a planta productora degut a la gran biomassa que genera en forma de gra, la facilitat de transformació i manipulació, i la rapidesa d'escalat que ofereix.

### **2.1. El promotor gammaZ no és específic de gra d'arròs**

La primera aproximació experimental realitzada ha consistit en avaluar la capacitat del promotor de la  $\gamma$ -zeïna de 27 kD de blat de moro (gammaZ) per provocar l'acumulació d'una proteïna recombinant específicament en gra d'arròs. En blat de moro el gen de la  $\gamma$ -zeïna està present només en una o dues còpies per genoma (Boronat, 1986), però el seu producte representa fins al 15% del contingut proteic de l'endosperma, fet que demostra la potent activitat del seu promotor durant el desenvolupament. Tot i així, encara que s'ha comprovat que gammaZ és actiu i específic en plantes transgèniques de blat de moro, aquesta és la primera vegada que s'utilitza en un sistema heteròleg.

Per a aquest estudi s'han transformat plantes d'arròs amb una construcció que conté la seqüència reguladora -1639/+61 del gen de la  $\gamma$ -zeïna (promotor gammaZ) fusionada a la seqüència codificant del gen *gusA* (GUS). L'anàlisi de l'activitat del promotor s'ha realitzat utilitzant exclusivament les línies amb una única integració del transgèn per tal d'eliminar la variabilitat d'expressió produïda per múltiples integracions. Els resultats obtinguts han mostrat que gammaZ és funcional durant el desenvolupament del gra d'arròs, presentant un màxim d'activitat GUS als 20 DAF (9434 pmols<sup>4</sup>-MU/min/mg de mitjana). Aquest patró temporal d'expressió encaixa amb l'activitat del promotor gammaZ en blat de moro, on el màxim d'expressió determinat

per *Northern Blot* es situa en els 15 DAF (Pérez-Grau i col., 1986). Així doncs, podem dir que gammaZ és actiu en gra d'arròs i presenta un patró d'expressió similar al de blat de moro. Tot i així, el seu nivell d'expressió és moderat si es compara amb altres promotors de proteïnes de reserva d'arròs (Qu i Takaiwa, 2004).

D'altra banda, mitjançant tinció histoquímica i l'anàlisi per fluorimetria de l'activitat GUS s'ha demostrat que gammaZ també és actiu en altres teixits de la planta. De fet, els nivells d'activitat GUS a fulla (8276 pmols<sup>4</sup>-MU/min/mg de mitjana) són similars als obtinguts en gra. Podem dir, per tant, que la seqüència reguladora -1639/+61 de la  $\gamma$ -zeïna no permet una expressió específica en gra. Així doncs, encara que gammaZ presenta una activitat moderada en gra d'arròs, el seu interès per a l'expressió de proteïnes recombinants es veu limitat per la inespecificitat de teixit. Per aquest motiu es va descartar per a l'expressió de la fusió Rx3-T20 en gra d'arròs.

L'estudi dels elements reguladors en *cis* necessaris per a l'expressió específica a l'endosperma d'arròs s'ha limitat a uns pocs gens de glutelines (Takaiwa i col., 1996 i 1999; Wu i col., 1998). Especialment important és l'element GCN4 que s'ha demostrat que és essencial per a l'especificitat d'endosperma en el gen de la glutelina 1 (Wu, 1998). De fet, la fusió de multímers d'aquest element al promotor 35S és suficient per induir l'expressió específica a endosperma en plantes transgèniques d'arròs. Els motius AACAA, ACGT i *Prolamin-Box* presents en els promotors de la majoria de proteïnes de reserva d'arròs semblen estar més relacionats amb una regulació quantitativa de l'expressió. Mitjançant experiments de guany de funció en plantes transgèniques d'arròs s'ha demostrat que la combinació dels elements GCN4, AACAA i ACGT és suficient per conferir un nivell detectable d'expressió a l'endosperma en el gen GluB1 (Wu, 2000). Tots els elements esmentats estan també presents en el promotor gammaZ de blat de moro (Marzàbal, 1998), fet que fa força sorprenent la seva inespecificitat en arròs. Una possible explicació és que la seqüència 3' flanquejant del gen de la  $\gamma$ -zeïna fos necessària per a l'especificitat de teixit en arròs. L'únic exemple d'un gen de proteïna de reserva en què són necessàries tant la regió 5' com la regió 3' flanquejants per conferir l'expressió específica a l'endosperma, és la prolamina de 10 kD. Qu i col. (2004) van aconseguir revertir l'expressió ectòpica de GUS generada per aquest promotor en plantes d'arròs transgèniques, canviant el terminador *nos* per la regió 3' no-codificant del gen natiu.

## 2.2. Expressió en gra d'arròs de Rx3-T20 amb el promotor RP5

Degut a la manca d'especificitat del promotor gammaZ en arròs, es va escollir la seqüència reguladora -1075/-1 respecte a l'inici de transcripció del gen de la prolamina de 13 kD (promotor RP5) per expressar la proteïna de fusió Rx3-T20 en plantes transgèniques d'arròs. També es van generar línies transgèniques, en les quals la mateixa proteïna era expressada sota el promotor constitutiu 35S amb la finalitat de comparar tant l'especificitat com el nivell d'expressió oferts per ambdós promotors.

L'anàlisi per *Western Blot* de les línies transgèniques revela que Rx3-T20 es pot detectar en gra i no en fulla quan és expressada sota el promotor RP5, mentre que amb el promotor 35S es pot detectar en ambdós teixits. Aquests resultats confirmen l'especificitat d'endosperma del promotor RP5 descrita per Pai-Hsiang i col. (2001), reafirmant-lo com un bon candidat per dirigir l'expressió de proteïnes recombinants en gra d'arròs. Els motius GCN4 i *G-box-like* presents en el promotor RP5 podrien ser responsables de la seva especificitat (Pai-Hsiang i col., 2001). Tot i així, en quant a nivell d'expressió, el promotor RP5 no ofereix cap avantatge respecte al promotor constituït 35S, ja que l'acumulació de Rx3-T20 en gra és molt similar en ambdós grups de línies transgèniques. D'altra banda, al comparar l'acumulació de Rx3-T20 en gra d'arròs amb la obtinguda en fulles de tabac es va observar que el gra d'arròs permet una major acumulació de la proteïna de fusió.

Diversos autors han demostrat que l'expressió de proteïnes recombinants en llavor de cereals beneficia la seva estabilitat (Stoger i col., 2005). Aquesta afirmació també es fa extensiva en el cas de Rx3-T20, ja que s'ha pogut comprovar que la proteïna de fusió no es degradada durant el desenvolupament del gra i resta estable en gra madur. Tot i així, en el nostre cas aquest fet no aporta cap avantatge respecte a l'expressió en fulla de tabac en què Rx3-T20 també es estable gràcies a la seva acumulació en orgànuls densos tipus CP.

### 2.3. Rx3-T20 s'acumula junt amb les prolamines d'arròs en CP-I

Com s'ha demostrat anteriorment, la proteïna de fusió Rx3-T20 és capaç d'acumular-se en uns orgànuls densos que probablement corresponen a CP quan es expressada en fulles de tabac. En l'endosperma d'arròs, però, l'entorn en què es troba la proteïna de fusió és completament diferent, fet que podria afectar la seva localització subcel·lular. En aquest cas, Rx3-T20 és expressada en un teixit especialitzat en l'emmagatzematge de proteïnes de reserva, les quals s'acumulen en dos poblacions diferents de CP. Mentre que les prolamines d'arròs formen CP de tipus I originats a partir del RE, les glutelines són transportades al Golgi, on formen CP de tipus II d'origen vacuolar (Yamagata i Tanaka, 1986; Krishnan i col., 1986).

El fraccionament subcel·lular de grans d'arròs transgènic ha revelat que Rx3 és localitza en una fracció densa, on també sedimenten els CP de tipus I i II d'arròs. A més, s'ha pogut comprovar que aquesta fracció es troba enriquida amb la xaperona BiP del RE, la qual s'ha demostrat que intervé en la biogènesi de CP-I (Li i col., 1993). Mitjançant immunocitoquímica de cèl·lules d'endosperma s'ha pogut determinar la localització exacte de la proteïna de fusió Rx3-T20 en CP de tipus I. No s'ha detectat proteïna recombinant ni en CP-II ni en l'apoplast. Així doncs, aquests resultats indiquen que Rx3-T20 no es capaç de generar CP per si sola en l'endosperma d'arròs, sinó que s'acumula en CP-I derivats de RE junt amb les prolamines natives.

Estudis de delecció de RNA indiquen que per a l'acumulació de les prolamines en CP de tipus I són necessaris dos elements en *cis*, anomenats *zip codes*, que

provoquen la síntesi localitzada en determinades regions del RE (Hamada i col., 2003). L'absència d'aquests elements en els transcrits de Rx3-T20 comporta que són les característiques de la proteïna de fusió el que determina la seva localització. Diversos estudis suggereixen la importància de la retenció al RE de la proteïna recombinant per a la seva acumulació en CP-I. Un bon exemple és l'expressió de la faseolina en plantes transgèniques d'arròs. Quan és expressada sense senyal de retenció al RE, s'acumula en CP-II (Zheng i col. 1995), mentre que si s'expressa incorporant el tetrapèptid KDEL en C-terminal, es localitza majoritàriament en CP-I (Frigerio i col, 2001). L'expressió d'anticossos scFv recombinants en què s'ha afegit el senyal de retenció al RE també resulta en la seva acumulació en CP-I (Nicholson, 2005). Encara que Rx3-T20 no presenta aquest senyal, les propietats dels dominis de  $\gamma$ -zeïna per autoensamblar-se podrien provocar que fos retinguda al RE. Així, la formació de oligòmers de Rx3-T20 impediria la seva sortida del RE, fent que quedés atrapada junt amb les prolamines d'arròs en CP-I. Una altra hipòtesi és que els dominis de  $\gamma$ -zeïna permetessin a la proteïna de fusió interaccionar amb les prolamines d'arròs impedit que seguís la ruta de secreció. Tant si la interacció és amb altres molècules de Rx3-T20 com amb les prolamines d'arròs, sembla que la formació de ponts disulfur intermoleculars per part de les cisteïnes dels dominis de  $\gamma$ -zeïna estaria involucrada, ja que és necessari incorporar un agent reductor per poder solubilitzar la proteïna de fusió.





## ***Conclusions***



## Conclusions

1. De l'estratègia emprada per a l'acumulació de T-20 recombinant en plantes se'n dedueix que, les quatre proteïnes de fusió (Rx3-T20, R3-T20, P4-T20 i X10-T20), que contenen seqüències riques en prolina de la  $\gamma$ -zeïna fusionades al inhibidor de VIH-1, presenten diferents nivells d'acumulació quan són expressades constitutivament en plantes de tabac. Com més llarga és la seqüència rica en prolina de  $\gamma$ -zeïna fusionada al T-20, major és el seu grau d'acumulació. Així doncs, la proteïna Rx3-T20, que conté els dos dominis, domini repetitiu i el domini Pro-X, és la més adient per acumular T-20 en fulles de tabac.
2. Els experiments de fraccionament subcel·lular i de immunodetecció realitzats sobre fulles de tabac transgènic ens han permès observar que la proteïna de fusió Rx3-T20 s'acumula en uns orgànuls cel·lulars molt densos equivalents als CP de blat de moro. La presència de BiP en aquests orgànuls revela que són derivats del RE. Aquests resultats suggereixen que els dominis rics en prolina de la  $\gamma$ -zeïna són capaços, com a gra de blat de moro, d'induir la formació de CP derivats de RE. En aquest cas però, la formació de CP té lloc en teixit vegetatiu, dins de cèl·lules no especialitzades en productes de reserva. Per tant, podem concloure que la capacitat d'inducció de CP no és un fenomen exclusiu de llavor i que és possible gràcies a la gran plasticitat del RE vegetal.
3. La proteïna recombinant Rx3-T20 es manté estable durant el creixement de la planta. Sorprenentment també es manté estable durant l'assecat de la fulla de tabac mentre que la majoria de proteïnes endògenes són degradades, suggerint que la proteïna recombinant acumulada dins els CP està protegida del control de qualitat del RE i d'altres proteases cel·lulars. Aquesta estabilitat proteica permet l'emmagatzematge del fàrmac T-20 en forma de fulla seca facilitant així el processament de la biomassa per a la seva posterior purificació.
4. S'ha desenvolupat un procés de purificació de la proteïna recombinant a partir de fulles seques de tabac que ha permès obtenir el inhibidor T-20 amb un grau de puresa del 90 %. El procés ha consistit en purificar la proteïna de fusió Rx3-T20 a partir d'extractes de fulla mitjançant precipitació proteica selectiva i cromatografia de bescanvi aniònic. Posteriorment, es va alliberar el T-20 de la fusió per digestió amb la proteasa Factor Xa i, finalment, es va aïllar el T-20 per HPLC semipreparatiu. El producte recombinant purificat va presentar per espectrometria de masses el mateix pes molecular que el inhibidor T-20 produït per síntesi química.
5. Els assaigs d'activitat demostren que el T-20 recombinant produït en plantes de tabac és capaç d'inhibir la mort cel·lular en cèl·lules humanes MT4 infectades amb VIH-1 a una CE50 de 2,2 ng/ml. Per altra banda, els assaigs de toxicitat ens indiquen que el producte recombinant purificat de plantes de tabac no és citotòxic a una concentració de 5 ng/ml. La seva capacitat d'inhibició és similar a la del mateix pèptid produït per síntesi química, del que es dedueix que l'expressió en plantes no afecta a l'activitat del T-20. Tanmateix, el T-20 de plantes sí que presenta una reducció en la capacitat d'inhibició respecte al fàrmac comercial, segurament provocada per la forma lliure dels seus extrems amino- i carboxi-terminals.

6. S'ha estudiat l'activitat del promotor del gen de la  $\gamma$ -zeïna (gammaZ), específic de l'endosperma de blat de moro, en plantes d'arròs. La seqüència reguladora -1639 a +61 respecte l'inici de transcripció d'aquest gen és activa durant el desenvolupament del gra en plantes transgèniques d'arròs. El seu patró temporal d'expressió en gra és similar al de blat de moro, presentant un màxim d'activitat de la proteïna marcador GUS a 20 DAF. Tot i així, s'han detectat nivells comparables d'activitat GUS a fulla, pel que es conclou que les seqüències utilitzades de gammaZ no són suficients per a conferir una expressió específica en l'endosperma d'arròs.
7. S'han obtingut línies transgèniques d'arròs que expressen la proteïna de fusió Rx3-T20 sota el promotor constitutiu 35S i el promotor específic de llavor RP5. La proteïna de fusió s'acumula de forma similar a gra en ambdós grups de línies i resta estable durant el seu desenvolupament. Comparativament, el grau d'acumulació de la proteïna recombinant Rx3-T20 a gra d'arròs és superior al obtingut en fulles fresques de tabac. Per tant, l'expressió en gra d'arròs és un bon sistema per acumular el fàrmac T-20 de forma estable.
8. Els estudis de fraccionament subcel·lular i de immunocitoquímica realitzats en les línies transgèniques d'arròs demostren que la proteïna de fusió Rx3-T20 s'acumula dins l'endosperma del gra d'arròs en CP derivats del RE (CP-I) junt amb les prolamines natives. No s'ha observat acumulació de la proteïna recombinant en els CP-II d'origen vacuolar on s'acumulen les glutelines. La capacitat de retenció al RE dels dominis rics en prolina de la fusió podria determinar aquesta localització subcel·lular.

## ***Bibliografia***



- Abranches, R., Marcel, S., Arcalis, E., Altmann, F., Fevereiro, P., and Stoger, E.** (2005). Plants as bioreactors: a comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. *J Biotechnol* **120**, 121-134.
- Ahner, A., and Brodsky, J.L.** (2004). Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol* **14**, 474-478.
- An, G., Ebert, P., and Mitra, A.** (1988). Binary Vectors. *Plant Mol Biol Manual* **A3**, 1-19.
- An, G., Watson, B.D., Stachel, S., Gordon, M.P., and Nester, E.W.** (1985). New cloning vehicles for transformation of higher plants. *Embo J* **4**, 277-284.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., and Vance, V.B.** (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13079-13084.
- Artsaenko, O., Kettig, B., Fiedler, U., Conrad, U., and Düring, K.** (1998). Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies. *Mol. Breed.* **4**, 313-319.
- Ausubel, F.M.** (2003). *Current protocols in molecular biology.* (John Wiley & Sons Inc.).
- Bai, Y., and Glatz, C.E.** (2003). Bioprocess considerations for expanded-bed chromatography of crude canola extract: sample preparation and adsorbent reuse. *Biotechnol Bioeng* **81**, 775-782.
- Bai, Y., Nikolov, Z.L., and Glatz, C.E.** (2002). Aqueous extraction of beta-glucuronidase from transgenic canola: kinetics and microstructure. *Biotechnol Prog* **18**, 1301-1305.
- Bakker, H., Bardor, M., Molthoff, J.W., Gomord, V., Elbers, I., Stevens, L.H., Jordi, W., Lommen, A., Faye, L., Lerouge, P., and Bosch, D.** (2001). Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2899-2904.
- Balasubramaniam, D., Wilkinson, C., Van Cott, K., and Zhang, C.** (2003). Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction. *J Chromatogr A* **989**, 119-129.
- Bardor, M., Faveeuw, C., Fitchette, A.C., Gilbert, D., Galas, L., Trottein, F., Faye, L., and Lerouge, P.** (2003). Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core alpha(1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology* **13**, 427-434.
- Bayley, C.C., Morgan, M., Dale, E.C., and Ow, D.W.** (1992). Exchange of gene activity in transgenic plants catalyzed by the Cre-lox site-specific recombination system. *Plant Mol Biol* **18**, 353-361.
- Birnboim, H.C.** (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100**, 243-255.
- Blixt, O., Allin, K., Pereira, L., Datta, A., and Paulson, J.C.** (2002). Efficient chemoenzymatic synthesis of O-linked sialyl oligosaccharides. *J Am Chem Soc* **124**, 5739-5746.
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A., and Hawes, C.** (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J* **15**, 441-447.
- Boronat, A., Martínez, M., Reina, M., Puigdomenech, P., and Palau, J.** (1986). Isolation and sequencing of a 28 kD glutelin-2 gene from maize: common elements in the 5' flanking regions among zein and glutelin genes. *Plant Science* **47**, 95-102.
- Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., Shark, K.B., and et al.** (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* **240**, 1534-1538.
- Breitler, J.C., Labeyrie, A., Meynard, D., Legavre, T., and Guiderdoni, E.** (2002). Efficient microprojectile bombardment-mediated transformation of rice using gene cassettes. *Theor Appl Genet* **104**, 709-719.
- Broothaerts, W., Mitchell, H.J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L.M., Yang, W., Mayer, J.E., Roa-Rodriguez, C., and Jefferson, R.A.** (2005). Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* **433**, 629-633.



- Carrington, J.C., and Freed, D.D.** (1990). Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J.Virol.* **64**, 1590-1597.
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M., and Kim, P.S.** (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-273.
- Chargelegue, D., Vine, N.D., van Dolleweerd, C.J., Drake, P.M., and Ma, J.K.** (2000). A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice. *Transgenic Res* **9**, 187-194.
- Chen, C.Y., and Shyu, A.B.** (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* **20**, 465-470.
- Chen, H.F., Chang, M.H., Chiang, B.L., and Jeng, S.T.** (2006). Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71. *Vaccine* **24**, 2944-2951.
- Choi, S.B., Wang, C., Muench, D.G., Ozawa, K., Franceschi, V.R., Wu, Y., and Okita, T.W.** (2000). Messenger RNA targeting of rice seed storage proteins to specific ER subdomains. *Nature* **407**, 765-767.
- Chong, D.K., and Langridge, W.H.** (2000). Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. *Transgenic Res* **9**, 71-78.
- Chong, D.K., Roberts, W., Arakawa, T., Illes, K., Bagi, G., Slattery, C.W., and Langridge, W.H.** (1997). Expression of the human milk protein beta-casein in transgenic potato plants. *Transgenic Res* **6**, 289-296.
- Christensen, A.H., and Quail, P.H.** (1996). Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res* **5**, 213-218.
- Christou, P.** (1996). Transformation technology. *Trends Plant Sci* **1**, 423-431.
- Church, G.M., and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1991-1995.
- Coligan, J.E.** (2004). *Current protocols in protein science.* (John Wiley & Sons Inc.).
- Commandeur, U., Twyman, R.M., and Fischer, R.** (2003). The biosafety of molecular farming in plants. *AgBiotechNet ABN*, 110.
- Conrad, U., and Fiedler, U.** (1998). Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol Biol* **38**, 101-109.
- Consoli, L., and Damerval, C.** (2001). Quantification of individual zein isoforms resolved by two-dimensional electrophoresis: genetic variability in 45 maize inbred lines. *Electrophoresis* **22**, 2983-2989.
- Cooley, L.A., and Lewin, S.R.** (2003). HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy. *J Clin Virol* **26**, 121-132.
- Cramer, C.L., Boothe, J.G., and Oishi, K.K.** (1999). Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. *Curr Top Microbiol Immunol* **240**, 95-118.
- Dalcol, I., Pons, M., Ludevid, M.D., and Giralte, E.** (1996). Convergent Synthesis of Repeating Peptides (Val-X-Leu-Pro-Pro)(<sub>8</sub>) Adopting a Polyproline II Conformation. *J Org Chem* **61**, 6775-6782.
- Daniell, H., Streatfield, S.J., and Wycoff, K.** (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* **6**, 219-226.
- Daniell, H., Khan, M.S., and Allison, L.** (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci* **7**, 84-91.
- Daniell, H., Lee, S.B., Panchal, T., and Wiebe, P.O.** (2001). Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol* **311**, 1001-1009.

- De Maagd, R.A., Bosch, D., and Stiekema, W.** (1999). *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci* **4**, 9-13.
- De Pater, B.S., van der Mark, F., Rueb, S., Katagiri, F., Chua, N.H., Schilperoort, R.A., and Hensgens, L.A.** (1992). The promoter of the rice gene GOS2 is active in various different monocot tissues and binds rice nuclear factor ASF-1. *Plant J* **2**, 837-844.
- De Rocher, E.J., Vargo-Gogola, T.C., Diehn, S.H., and Green, P.J.** (1998). Direct evidence for rapid degradation of *Bacillus thuringiensis* toxin mRNA as a cause of poor expression in plants. *Plant Physiol* **117**, 1445-1461.
- Draper, J.** (1988). *Plant genetic transformation and gene expression : a laboratory manual.* (Oxford ; Boston: Blackwell Scientific Publications).
- Ellgaard, L., and Helenius, A.** (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-191.
- Evangelista, R.L., Kusnadi, A.R., Howard, J.A., and Nikolov, Z.L.** (1998). Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant beta-glucuronidase from transgenic corn. *Biotechnol Prog* **14**, 607-614.
- Faye, L., Boulaflous, A., Benchabane, M., Gomord, V., and Michaud, D.** (2005). Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* **23**, 1770-1778.
- Fischer, R., and Emans, N.** (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res* **9**, 279-299.
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., and Twyman, R.M.** (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 152-158.
- Fischer, R., Vaquero-Martin, C., Sack, M., Drossard, J., Emans, N., and Commandeur, U.** (1999). Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnol Appl Biochem* **30 ( Pt 2)**, 113-116.
- Frankel, A.D., and Young, J.A.** (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**, 1-25.
- Frigerio, L., Pastres, A., Prada, A., and Vitale, A.** (2001). Influence of KDEL on the fate of trimeric or assembly-defective phaseolin: selective use of an alternative route to vacuoles. *Plant Cell* **13**, 1109-1126.
- Frisch, D.A., Harris-Haller, L.W., Yokubaitis, N.T., Thomas, T.L., Hardin, S.H., and Hall, T.C.** (1995). Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Mol Biol* **27**, 405-409.
- Galili, G., Altschuler, Y., and Levanony, H.** (1993). Assembly and transport of seed storage proteins. *Trends Cell Biol* **3**, 437-442.
- Gallie, D.R., and Kado, C.I.** (1989). A translational enhancer derived from tobacco mosaic virus is functionally equivalent to a Shine-Dalgarno sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 129-132.
- Gallie, D.R., Sleat, D.E., Watts, J.W., Turner, P.C., and Wilson, T.M.** (1987). A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression in vivo. *Nucleic Acids Res* **15**, 8693-8711.
- Garoosi, G.A., Salter, M.G., Caddick, M.X., and Tomsett, A.B.** (2005). Characterization of the ethanol-inducible alc gene expression system in tomato. *J Exp Bot* **56**, 1635-1642.
- Geli, M.I., Torrent, M., and Ludevid, D.** (1994). Two Structural Domains Mediate Two Sequential Events in [gamma]-Zein Targeting: Protein Endoplasmic Reticulum Retention and Protein Body Formation. *Plant Cell* **6**, 1911-1922.
- Gelvin, S.B.** (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 16-37, table of contents.
- Gerngross, T.U.** (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol* **22**, 1409-1414.
- Gleba, Y., Klimyuk, V., and Marillonnet, S.** (2005). Magniffection--a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* **23**, 2042-2048.

- Gomord, V., Chamberlain, P., Jefferis, R., and Faye, L.** (2005). Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol* **23**, 559-565.
- Hamada, S., Ishiyama, K., Sakulsingharoj, C., Choi, S.B., Wu, Y., Wang, C., Singh, S., Kawai, N., Messing, J., and Okita, T.W.** (2003). Dual regulated RNA transport pathways to the cortical region in developing rice endosperm. *Plant Cell* **15**, 2265-2272.
- Hanson, B., Engler, D., Moy, Y., Newman, B., Ralston, E., and Gutterson, N.** (1999). A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J* **19**, 727-734.
- Headon, D.R., and Walsh, G.** (1994). The industrial production of enzymes. *Biotechnol Adv* **12**, 635-646.
- Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y.** (1995). Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.
- Hiei, Y., Komari, T., and Kubo, T.** (1997). Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* **35**, 205-218.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., and Kumashiro, T.** (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* **6**, 271-282.
- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R.** (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**, 389-392.
- Hood, E.E., Bailey, M.R., Beifuss, K., Magallanes-Lundback, M., Horn, M.E., Callaway, E., Drees, C., Delaney, D.E., Clough, R., and Howard, J.A.** (2003). Criteria for high-level expression of a fungal laccase gene in transgenic maize. *Plant Biotechnol. J.* **1**, 129-140.
- Hood, E.E., Witcher, D., Maddock, S., Meyer, T., Baszczyński, C., Bailey, M., Flynn, P., Register, J., Marshall, L., Bond, D., Kulisek, E., Kusnadi, A., Evangelista, R., Nikolov, Z., Wooge, C., Mehigh, R., Hernan, R., Kappel, B., Ritland, D., Chung-Ping, L., and Howard, J.** (1997). Commercial Production of Avidin from Transgenic Maize: Characterization of Transformant, Production, Processing, Extraction and Purification. *Mol. Breed.* **3**, 291-306.
- Horvath, H., Huang, J., Wong, O., Kohl, E., Okita, T., Kannangara, C.G., and von Wettstein, D.** (2000). The production of recombinant proteins in transgenic barley grains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1914-1919.
- Hudspeth, R.L., and Guala, J.W.** (1989). Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C4 photosynthesis. *Plant Mol Biol* **12**, 579-589.
- Hwang, Y.S., McCullar, C., and Huang, N.** (2001). Evaluation of expression cassettes in developing rice endosperm using a transient expression assay. *Plant Science* **161**, 1107-1116.
- Hwang, Y.S., Yang, D., McCullar, C., Wu, L., Chen, L., Pham, P., Nandi, S., and Huang, N.** (2002). Analysis of the rice endosperm-specific globulin promoter in transformed rice cells. *Plant Cell Rep.* **20**, 842-847.
- Ingelbrecht, I.L., Herman, L.M., Dekeyser, R.A., Van Montagu, M.C., and Depicker, A.G.** (1989). Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells. *Plant Cell* **1**, 671-680.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* **6**, 3901-3907.
- Johansen, L.K., and Carrington, J.C.** (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol* **126**, 930-938.
- Jones, P.L., Korte, T., and Blumenthal, R.** (1998). Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors. *J Biol Chem* **273**, 404-409.
- Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M.C., and Angenon, G.** (1996). An *Agrobacterium* mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci* **122**, 101-108.

- Katsube, T., Kurisaka, N., Ogawa, M., Maruyama, N., Ohtsuka, R., Utsumi, S., and Takaiwa, F.** (1999). Accumulation of soybean glycinin and its assembly with the glutelins in rice. *Plant Physiol* **120**, 1063-1074.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M., and McPherson, J.** (1987). Duplication of CaMV-35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**, 1299-1302.
- Khoudi, H., Laberge, S., Ferullo, J.M., Bazin, R., Darveau, A., Castonguay, Y., Allard, G., Lemieux, R., and Vezina, L.P.** (1999). Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnol Bioeng* **64**, 135-143.
- Kilby, J.M., Hopkins, S., Venetta, T.M., DiMassimo, B., Cloud, G.A., Lee, J.Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M.R., Nowak, M.A., Shaw, G.M., and Saag, M.S.** (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* **4**, 1302-1307.
- Kleizen, B., and Braakman, I.** (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 343-349.
- Knoblauch, M., Hibberd, J.M., Gray, J.C., and van Bel, A.J.** (1999). A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes. *Nat Biotechnol* **17**, 906-909.
- Kogan, M.J., Lopez, O., Cocera, M., Lopez-Iglesias, C., De La Maza, A., and Giralt, E.** (2004). Exploring the interaction of the surfactant N-terminal domain of gamma-Zein with soybean phosphatidylcholine liposomes. *Biopolymers* **73**, 258-268.
- Kogan, M.J., Dalcol, I., Gorostiza, P., Lopez-Iglesias, C., Pons, M., Sanz, F., Ludevid, D., and Giralt, E.** (2001). Self-assembly of the amphipathic helix (VHLPPP)<sub>8</sub>. A mechanism for zein protein body formation. *J Mol Biol* **312**, 907-913.
- Kogan, M.J., Dalcol, I., Gorostiza, P., Lopez-Iglesias, C., Pons, R., Pons, M., Sanz, F., and Giralt, E.** (2002). Supramolecular properties of the proline-rich gamma-Zein N-terminal domain. *Biophys J* **83**, 1194-1204.
- Kozak, M.** (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
- Kozziel, M.G., Carozzi, N.B., and Desai, N.** (1996). Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. *Plant Mol Biol* **32**, 393-405.
- Krishnan, H.B., Franceschi, V.R., and Okita, T.** (1986). Immunochemical studies on the role of the Golgi complex in protein-body formation in rice cells. *Planta* **169**, 471-480.
- Kusnadi, A.R., Evangelista, R.L., Hood, E.E., Howard, J.A., and Nikolov, Z.L.** (1998). Processing of transgenic corn seed and its effect on the recovery of recombinant beta-glucuronidase. *Biotechnol Bioeng* **60**, 44-52.
- Kusnadi, A.R., Hood, E.E., Witcher, D.R., Howard, J.A., and Nikolov, Z.L.** (1998). Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. *Biotechnol Prog* **14**, 149-155.
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., and Hendrickson, W.A.** (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**, 648-659.
- LaBranche, C.C., Galasso, G., Moore, J.P., Bolognesi, D.P., Hirsch, M.S., and Hammer, S.M.** (2001). HIV fusion and its inhibition. *Antiviral Res* **50**, 95-115.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamacchia, C., Shewry, P.R., Di Fonzo, N., Forsyth, J.L., Harris, N., Lazzeri, P.A., Napier, J.A., Halford, N.G., and Barcelo, P.** (2001). Endosperm-specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed. *J Exp Bot* **52**, 243-250.
- Leelavathi, S.i.c.** (2003). Overproduction of an alkali-and thermostable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme. *Mol. Breed.* **11**, 59-67.

- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., and Boedtker, H.** (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751.
- Li, X., Wu, Y., Zhang, D.Z., Gillikin, J.W., Boston, R.S., Franceschi, V.R., and Okita, T.W.** (1993). Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP-mediated process. *Science* **262**, 1054-1056.
- Liu, S., Lu, H., Niu, J., Xu, Y., Wu, S., and Jiang, S.** (2005). Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J Biol Chem* **280**, 11259-11273.
- Ludevid, M.D.; Martínez-Izquierdo, J.A.; Armengol, M.; Torrent, M.; Puigdomènech, P.; Palau, J.** (1985). Immunological relations between glutelin-2 and low molecular weight zein-2 proteins from maize (*Zea Mays* L) endosperm. *Plant Science* **41**, 41-48.
- Ludevid, D., Torrent, M., Martínez-Izquierdo, J.A., Puigdomenech, P., and Palau, J.** (1984). Subcellular localization of glutelin-2 in maize (*Zea Mays* L.) endosperm. *Plant Mol Biol* **3**, 227-234.
- Ma, J.K., Drake, P.M., and Christou, P.** (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* **4**, 794-805.
- Mackenzie, J.M., and Westaway, E.G.** (2001). Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol* **75**, 10787-10799.
- Mainieri, D., Rossi, M., Archinti, M., Bellucci, M., De Marchis, F., Vavassori, S., Pompa, A., Arcioni, S., and Vitale, A.** (2004). Zeolin. A new recombinant storage protein constructed using maize gamma-zein and bean phaseolin. *Plant Physiol* **136**, 3447-3456.
- Maliga, P.** (2002). Engineering the plastid genome of higher plants. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 164-172.
- Mansky, L.M., and Temin, H.M.** (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* **69**, 5087-5094.
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., and Gleba, Y.** (2005). Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* **23**, 718-723.
- Martineau, B., Voelker, T.A., and Sanders, R.A.** (1994). On Defining T-DNA. *Plant Cell* **6**, 1032-1033.
- Marzabal, P., Busk, P.K., Ludevid, M.D., and Torrent, M.** (1998). The bifactorial endosperm box of gamma-zein gene: characterisation and function of the Pb3 and GZM cis-acting elements. *Plant J* **16**, 41-52.
- Matsuoka, M., Kano-Murakami, Y., Tanaka, Y., Ozeki, Y., and Yamamoto, N.** (1987). Nucleotide sequence of cDNA encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from maize. *J Biochem (Tokyo)* **102**, 673-676.
- McGarvey, P.B., Hammond, J., Dienelt, M.M., Hooper, D.C., Fu, Z.F., Dietzschold, B., Koprowski, H., and Michaels, F.H.** (1995). Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology (N Y)* **13**, 1484-1487.
- Mejare, M., Lilius, G., and Bulow, L.** (1998). Evaluation of genetically attached histidine affinity tails for purification of lactate dehydrogenase from transgenic tobacco. *Plant Sci* **134**, 103-114.
- Menkhaus, T.J., Bai, Y., Zhang, C., Nikolov, Z.L., and Glatz, C.E.** (2004). Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants. *Biotechnol Prog* **20**, 1001-1014.
- Miele, L.** (1997). Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. *Trends Biotechnol* **15**, 45-50.
- Millan, A.F.-S.i.c.** (2003). A chloplast transgenic approach to hyperexpress and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnol.* **1**, 77-79.

- Mironov, A.A., Beznoussenko, G.V., Nicoziani, P., Martella, O., Trucco, A., Kweon, H.S., Di Giandomenico, D., Polishchuk, R.S., Fusella, A., Lupetti, P., Berger, E.G., Geerts, W.J., Koster, A.J., Burger, K.N., and Luini, A.** (2001). Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *J Cell Biol* **155**, 1225-1238.
- Moloney, M.M.** (1995). Molecular farming in plants: achievements and prospects. *Biotechnol Eng* **9**, 3-9.
- Moore, P.J., Swords, K.M., Lynch, M.A., and Staehelin, L.A.** (1991). Spatial organization of the assembly pathways of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *J Cell Biol* **112**, 589-602.
- Morassutti, C., De Amicis, F., Skerlavaj, B., Zanetti, M., and Marchetti, S.** (2002). Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS Lett* **519**, 141-146.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.
- Muntz, K.** (1998). Deposition of storage proteins. *Plant Mol Biol* **38**, 77-99.
- Nicholson, L., Gonzalez-Melendi, P., van Dolleweerd, C.J., Tuck, H., Perrin, Y., Ma, J.K., Fischer, R., Christou, P., and Stoger, E.** (2005). A recombinant multimeric immunoglobulin expressed in rice shows assembly-dependent subcellular localization in endosperm cells. *Plant Biotechnol.* **3**, 115-127.
- Niepel, M., and Gallie, D.R.** (1999). Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *J Virol* **73**, 9080-9088.
- Nikolov, Z.L., and Woodard, S.L.** (2004). Downstream processing of recombinant proteins from transgenic feedstock. *Curr Opin Biotechnol* **15**, 479-486.
- Nuttall, J., Vine, N., Hadlington, J.L., Drake, P., Frigerio, L., and Ma, J.K.** (2002). ER-resident chaperone interactions with recombinant antibodies in transgenic plants. *Eur J Biochem* **269**, 6042-6051.
- O'Dell, J.T., Nagy, F., and Chua, N.H.** (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-812.
- Offringa, R., de Groot, M.J., Haagsman, H.J., Does, M.P., van den Elzen, P.J., and Hooykaas, P.J.** (1990). Extrachromosomal homologous recombination and gene targeting in plant cells after *Agrobacterium* mediated transformation. *Embo J* **9**, 3077-3084.
- Ohme-Takagi, M., Taylor, C.B., Newman, T.C., and Green, P.J.** (1993). The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11811-11815.
- O'Neill, C., Horvath, G.V., Horvath, E., Dix, P.J., and Medgyesy, P.** (1993). Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *Plant J* **3**, 729-738.
- Padidam, M.** (2003). Chemically regulated gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 169-177.
- Pai-Hsiang, S., Su-May, Y., and Ching-San, C.** (2001). Spatial and temporal expression of a rice prolamin gene RP5 promoter in transgenic tobacco and rice. *J. Plant Physiol.* **158**, 247-254.
- Pauwels, R., Balzarini, J., Baba, M., Snoeck, R., Schols, D., Herdewijn, P., Desmyter, J., and De Clercq, E.** (1988). Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J Virol Methods* **20**, 309-321.
- Perez-Grau, L., Cortadas, J., Puigdomenech, P., and Palau, J.** (1986). Accumulation and subcellular localization of glutelin-2 transcripts during maturation of maize endosperm. *FEBS Lett* **202**, 145-148.

- Perrin, Y., Vaquero, C., Gerrard, I., Sack, M., Drossard, J., Stoger, E., Christou, P., and Fischer, R.** (2000). Transgenic pea seeds as bioreactors for the production of a single-chain Fv fragment (scFV) antibody used in cancer diagnosis and therapy. *Mol. Breed.* **6**, 345-352.
- Philip, R., Darnowski, D.W., Maughan, P.J., and Vodkin, L.O.** (2001). Processing and localization of bovine beta-casein expressed in transgenic soybean seeds under control of a soybean lectin expression cassette. *Plant Sci* **161**, 323-335.
- Phillipson, B.A., Pimpl, P., daSilva, L.L., Crofts, A.J., Taylor, J.P., Movafeghi, A., Robinson, D.G., and Denecke, J.** (2001). Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COPII dependent. *Plant Cell* **13**, 2005-2020.
- Pimpl, P., Taylor, J.P., Snowden, C., Hillmer, S., Robinson, D.G., and Denecke, J.** (2006). Golgi-mediated vacuolar sorting of the endoplasmic reticulum chaperone BiP may play an active role in quality control within the secretory pathway. *Plant Cell* **18**, 198-211.
- Plasterk, R.H., and Ketting, R.F.** (2000). The silence of the genes. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 562-567.
- Porta, C., and Lomonossoff, G.P.** (1996). Use of viral replicons for the expression of genes in plants. *Mol Biotechnol* **5**, 209-221.
- Prat, S., Cortadas, J., Puigdomenech, P., and Palau, J.** (1985). Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of the maize endosperm protein glutelin-2. *Nucleic Acids Res* **13**, 1493-1504.
- Qu, L., and Takaiwa, F.** (2004). Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice. *Plant Biotechnol. J.* **2**, 113-125.
- Rais-Beghdadi, C., Roggero, M.A., Fasel, N., and Reymond, C.D.** (1998). Purification of recombinant proteins by chemical removal of the affinity tag. *Appl Biochem Biotechnol* **74**, 95-103.
- Ray, M.V., Van Duyne, P., Bertelsen, A.H., Jackson-Matthews, D.E., Sturmer, A.M., Merkler, D.J., Consalvo, A.P., Young, S.D., Gilligan, J.P., and Shields, P.P.** (1993). Production of recombinant salmon calcitonin by in vitro amidation of an *Escherichia coli* produced precursor peptide. *Biotechnology (N Y)* **11**, 64-70.
- Richter, L.J., Thanavala, Y., Arntzen, C.J., and Mason, H.S.** (2000). Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol* **18**, 1167-1171.
- Risseuw, E., Offringa, R., Franke-van Dijk, M.E., and Hooykaas, P.J.** (1995). Targeted recombination in plants using *Agrobacterium* coincides with additional rearrangements at the target locus. *Plant J* **7**, 109-119.
- Rouwendal, G.J., Mendes, O., Wolbert, E.J., and Douwe de Boer, A.** (1997). Enhanced expression in tobacco of the gene encoding green fluorescent protein by modification of its codon usage. *Plant Mol Biol* **33**, 989-999.
- Russell, D.A., and Fromm, M.E.** (1997). Tissue-specific expression in transgenic maize of four endosperm promoters from maize and rice. *Transgenic Res* **6**, 157-168.
- Saalbach, I., Giersberg, M., and Conrad, U.** (2001). High-level expression of a single-chain Fv (scFv) antibody in transgenic pea seeds. *J. Plant Physiol.* **158**, 529-533.
- Sallaud, C., Meynard, D., van Boxtel, J., Gay, C., Bes, M., Brizard, J.P., Larmande, P., Ortega, D., Raynal, M., Portefaix, M., Ouwkerk, P.B., Rueb, S., Delseny, M., and Guiderdoni, E.** (2003). Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor Appl Genet* **106**, 1396-1408.
- Samalova, M., Brzobohaty, B., and Moore, I.** (2005). pOp6/LhGR: a stringently regulated and highly responsive dexamethasone-inducible gene expression system for tobacco. *Plant J* **41**, 919-935.
- Sambrook, J., and Russell, D.W.** (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual.* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Schillberg, S., Emans, N., and Fischer, R.** (2002). Antibody molecular farming in plants and plant cells. *Phytochem.* **1**, 45-54.
- Schillberg, S., Twyman, R.M., and Fischer, R.** (2005). Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants—technology assessment. *Vaccine* **23**, 1764-1769.
- Schillberg, S., Zimmermann, S., Voss, A., and Fischer, R.** (1999). Apoplasmic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic Res* **8**, 255-263.
- Schillberg, S., Zimmermann, S., Finlay, K., and Fischer, R.** (2000). Plasma membrane display of anti-viral single chain Fv fragments confers resistance to tobacco mosaic virus. *Mol Breed* **6**, 317-326.
- Schittko, U., Hermsmeier, D., and Baldwin, I.T.** (2001). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. II. Accumulation of plant mRNAs in response to insect-derived cues. *Plant Physiol* **125**, 701-710.
- Schunmann, P.H.D., Coia, G., and Waterhouse, P.M.** (2002). Biopharming the SimpliRED HIV diagnostic reagent in barley, potato and tobacco. *Mol. Breed.* **9**, 113-121.
- Schunmann, P.H.D., Surin, B., and Waterhouse, P.M.** (2003). A suite of novel promoters and terminators for plant biotechnology II. The pPLEX series for use in monocots. *Funct. Plant Biol.* **30**, 453-460.
- Segal, D.J., Stege, J.T., and Barbas, C.F., 3rd.** (2003). Zinc fingers and a green thumb: manipulating gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 163-168.
- Senejani, A.G., Hilario, E., and Gogarten, J.P.** (2001). The intein of the *Thermoplasma* A-ATPase A subunit: structure, evolution and expression in *E. coli*. *BMC Biochem* **2**, 13.
- Seon, J.H., Szarka, S.J., and Moloney, M.M.** (2002). A unique strategy for recovering recombinant proteins from molecular farming: affinity capture on engineered oilbodies. *J Plant Biotechnol* **4**, 95 – 101.
- Shah, M.M., Fujiyama, K., Flynn, C.R., and Joshi, L.** (2003). Sialylated endogenous glycoconjugates in plant cells. *Nat Biotechnol* **21**, 1470-1471.
- Shewry, P.R., and Halford, N.G.** (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot* **53**, 947-958.
- Shewry, P.R., Napier, J.A., and Tatham, A.S.** (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 945-956.
- Shockett, P.E., and Schatz, D.G.** (1996). Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5173-5176.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Sriraman, R., Bardor, M., Sack, M., Vaquero, C., Faye, L., Fischer, R., Finnern, R., and Lerouge, P.** (2004). Recombinant anti-hcg antibodies retained in the endoplasmic- reticulum of transformed plants lack core-xylose and core- alpha(1,3)-fucose residues. *Plant Biotechnol. J.* **2**, 279-287.
- Staub, J.M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P.T., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J.A., Spatola, L., Ward, D., Ye, G., and Russell, D.A.** (2000). High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* **18**, 333-338.
- Stoger, E., Sack, M., Fischer, R., and Christou, P.** (2002). Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 161-166.
- Stoger, E., Ma, J.K., Fischer, R., and Christou, P.** (2005). Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 167-173.



- Stoger, E., Vaquero, C., Torres, E., Sack, M., Nicholson, L., Drossard, J., Williams, S., Keen, D., Perrin, Y., Christou, P., and Fischer, R.** (2000). Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol* **42**, 583-590.
- Takaiwa, F., Yamanouchi, U., Yoshihara, T., Washida, H., Tanabe, F., Kato, A., and Yamada, K.** (1996). Characterization of common cis-regulatory elements responsible for the endosperm-specific expression of members of the rice glutelin multigene family. *Plant Mol Biol* **30**, 1207-1221.
- Takemoto, Y., Coughlan, S.J., Okita, T.W., Satoh, H., Ogawa, M., and Kumamaru, T.** (2002). The rice mutant *esp2* greatly accumulates the glutelin precursor and deletes the protein disulfide isomerase. *Plant Physiol* **128**, 1212-1222.
- Taylor, C.B.** (1997). Comprehending cosuppression. *Plant Cell* **9**, 1245-1249.
- Torrent, M., Geli, M.I., Ruiz-Avila, L., Canals, J.M., Puigdomenech, P., and Ludevid, D.** (1994). Role of structural domains for maize gamma-zein retention in *Xenopus* oocytes. *Planta* **192**, 512-518.
- Tregoning, J.S., Nixon, P., Kuroda, H., Svab, Z., Clare, S., Bowe, F., Fairweather, N., Ytterberg, J., van Wijk, K.J., Dougan, G., and Maliga, P.** (2003). Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res* **31**, 1174-1179.
- Turner, B.G., and Summers, M.F.** (1999). Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**, 1-32.
- Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., and Fischer, R.** (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol* **21**, 570-578.
- Ueda, T., Wang, Z., Pham, N., and Messing, J.** (1994). Identification of a transcriptional activator-binding element in the 27-kilodalton zein promoter, the -300 element. *Mol Cell Biol* **14**, 4350-4359.
- Unger, E., Cigan, A.M., Trimnell, M., Xu, R.J., Kendall, T., Roth, B., and Albertsen, M.** (2002). A chimeric ecdysone receptor facilitates methoxyfenozide-dependent restoration of male fertility in *ms45* maize. *Transgenic Res* **11**, 455-465.
- Vain, P., Finer, K.R., Engler, D.E., Pratt, R.C., and Finer, J.J.** (1996). Intron-mediated enhancement of gene expression in maize (*Zea mays* L.) and bluegrass (*Poa pratensis* L.). *Plant Cell Rep.* **15**, 489-494.
- Vaquero, C., Sack, M., Chandler, J., Drossard, J., Schuster, F., Monecke, M., Schillberg, S., and Fischer, R.** (1999). Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11128-11133.
- Vergunst, A.C., and Hooykaas, P.J.** (1998). Cre/lox-mediated site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* by transient expression of cre. *Plant Mol Biol* **38**, 393-406.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* **33**, 949-956.
- Wada, K., Wada, Y., Ishibashi, F., Gojobori, T., and Ikemura, T.** (1992). Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Res* **20 Suppl**, 2111-2118.
- Wandelt, C.I., Khan, M.R., Craig, S., Schroeder, H.E., Spencer, D., and Higgins, T.J.** (1992). Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *Plant J* **2**, 181-192.
- Wang, Y., Chen, B., Hu, Y., Li, J., and Lin, Z.** (2005). Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the cre/lox site-specific recombination system. *Transgenic Res* **14**, 605-614.
- Washida, H., Wu, C.Y., Suzuki, A., Yamanouchi, U., Akihama, T., Harada, K., and Takaiwa, F.** (1999). Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene *GluB-1*. *Plant Mol Biol* **40**, 1-12.

- Wild, C., Greenwell, T., and Matthews, T.** (1993). A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 1051-1053.
- Witcher, D.R., Hood, E., Peterson, D., Bailey, M., Marshall, L., Bond, D., Kusnadi, A., Evangelista, R., Nikolov, Z., Wooge, C., Mehig, R., Kappel, B., Ritland, D., Register, J., and Howard, J.** (1998). Commercial Production of Beta-Glucuronidase (GUS): A Model System for the Production of Proteins in Plants. *Mol. Breed.* **4**, 301-312.
- Wu, C.Y., Suzuki, A., Washida, H., and Takaiwa, F.** (1998). The GCN4 motif in a rice glutelin gene is essential for endosperm-specific gene expression and is activated by Opaque-2 in transgenic rice plants. *Plant J* **14**, 673-683.
- Wu, C., Washida, H., Onodera, Y., Harada, K., and Takaiwa, F.** (2000). Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression. *Plant J* **23**, 415-421.
- Wurm, F.M.** (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* **22**, 1393-1398.
- Xue, G.P., Patel, M., Johnson, J.S., Smyth, D.J., and Vickers, C.E.** (2003). Selectable marker-free transgenic barley producing a high level of cellulase (1,4-beta-glucanase) in developing grains. *Plant Cell Rep.* **21**, 1088-1094.
- Yamagata, H., and Tanaka, K.** (1986). The site of synthesis and accumulation of rice storage proteins. *Plant Cell Physiol* **27**, 135-145.
- Yang, D.C., Guo, F.L., Liu, B., Huang, N., and Watkins, S.C.** (2003). Expression and localization of human lysozyme in the endosperm of transgenic rice. *Plant Cell Rep.* **21**, 597-603.
- Yu, J., and Langridge, W.** (2003). Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice. *Transgenic Res* **12**, 163-169.
- Zheng, Z., Sumi, K., Tanaka, K., and Murai, N.** (1995). The Bean Seed Storage Protein [beta]-Phaseolin Is Synthesized, Processed, and Accumulated in the Vacuolar Type-II Protein Bodies of Transgenic Rice Endosperm. *Plant Physiol* **109**, 777-786.
- Zuo, J., Niu, Q.W., Moller, S.G., and Chua, N.H.** (2001). Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nat Biotechnol* **19**, 157-161.