

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**  
**INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE**  
**PLANTAS (IBMCP)**



**Producción en plantas de nanopartículas  
recombinantes derivadas del virus  
del grabado del tabaco**

**Trabajo Fin de Máster**

**Autor:** Enrique Lozano Sánchez

**Directores científicos:**

Fernando Uriel Merwaiss

José Antonio Darós Arnau

Febrero, 2022

# Agradecimientos

Aprovechando esta oportunidad, me gustaría plasmar en unas pocas líneas mi agradecimiento a todas las personas que han permitido que este TFM sea posible.

Agradecer en primer lugar a José Antonio, por brindarme la oportunidad de incorporarme a un gran grupo de investigación y permitir que me sumerja en un tema de investigación tan novedoso y apasionante como son las nanopartículas.

Gracias Fernando por confiar en mí, por tu paciencia y apoyo durante todos estos meses y por ser, además de jefe, un buen amigo con el que hablar tranquilamente de la vida y poder tomarse unas cervecillas. He aprendido muchísimo en estos meses y siempre te lo agradeceré.

Agradecer también a todos mis compañeros del laboratorio (Vero, María, Arcadio, Mari Carmen, Mireia, Beltrán, Marcelo...) por ayudarme siempre en todo lo que habéis podido y más y por ser simplemente geniales.

A todos mis chavales, el grupito de amigos que vinimos cada uno de una parte de España distinta para estudiar plantitas y que, a día de hoy, se han convertido en una parte importante de mi vida. En especial agradecer a mi compi Tamara, que nos llevamos aguantando muchos años ya, y los que quedan.

Agradecer a mi familia a la que cuanto más lejos tengo más quiero. Esté en Valencia, Alemania o China siempre estarán ahí para apoyarme, aconsejarme y abrazarme en los momentos más difíciles. Todo lo que he conseguido hasta ahora es gracias a vosotros.

Finalmente, agradecerte a ti, abuela, todo lo que has hecho por nosotros. Somos lo que somos gracias a ti y gracias, gracias por ser ese ejemplo del que estar orgulloso a rabiar. Espero que tú también estés orgullosa de nosotros.

Ha sido un largo camino hasta llegar hasta aquí,  
pero esto solo acaba de empezar.

## RESUMEN

El uso biotecnológico de nanopartículas virales (VNPs) suscita un gran interés debido a sus potenciales aplicaciones biotecnológicas en campos como la medicina o la nanotecnología. Las VNPs permiten la presentación de epítopes de interés fusionados a las proteínas de cubierta (CP) virales. En este trabajo se describe la generación de nanopartículas virales recombinantes derivadas del virus del grabado del tabaco (TEV) en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Por un lado, hemos producido VNPs genéticamente modificadas capaces de presentar en su superficie la proteína fluorescente verde (GFP) o la roja mCherry. De forma similar a lo reportado para otros virus, la inserción de la secuencia de escape ribosomal F2A derivada de picornavirus fue necesaria para generar una población mixta de CPs decoradas y sin modificar que permitan el correcto ensamblaje de la partícula viral. Por otro lado, hemos comenzado con el desarrollo de VNPs híbridas capaces de exponer en su superficie dos proteínas distintas. Para ello generamos un sistema de coinfección de TEV junto a un vector viral derivado del virus X de la patata (PVX), capaz de producir una segunda CP de TEV en *trans*. La capacidad infectiva de los clones virales recombinantes y la presencia de las proteínas de interés en la progenie viral fue analizada por ensayos de RT-PCR y de Western-blot, así como por microscopía de fluorescencia. Finalmente, con el objetivo de en un próximo paso analizar el correcto ensamblaje de las VNPs recombinantes generadas, optimizamos un protocolo eficiente de purificación de partículas virales de TEV, las cuales pudieron ser observadas por microscopía electrónica de transmisión. Estas VNPs recombinantes presentando una o más proteínas de interés sobre su superficie constituyen una novedosa herramienta biotecnológica con potenciales aplicaciones en la medicina, tales como su uso como vacunas, biosensores o en marcaje celular.

**Palabras clave:** nanopartículas; VNP; vectores virales; virus del grabado del tabaco; virus X de la patata; proteínas fluorescentes.

## ABSTRACT

The biotechnological use of viral nanoparticles (VNP) arouses great interest due to their potential biotechnological applications in fields such as medicine or nanotechnology. VNPs allow the presentation of epitopes of interest fused to viral coat proteins (CP). In this work, the generation of recombinant viral nanoparticles derived from tobacco etch virus (TEV) in *Nicotiana benthamiana* plants is described. On the one hand, we have produced genetically modified VNPs capable of presenting green fluorescent protein (GFP) or red fluorescent protein (mCherry) on their surface. According to previous reports in other virus, insertion of the F2A ribosomal escape sequence derived from picornavirus was necessary to generate a mixed population of decorated and unmodified CPs that allowed the correct assembly of the viral particles. On the other hand, we have started the development of hybrid VNPs capable of exposing two different proteins on their surface. To do this, we generated a coinfection system based on TEV together with a viral vector derived from potato virus X (PVX), capable of producing a second TEV CP in *trans*. The infective capacity of the recombinant viral clones and the presence of the interest proteins in the viral progeny were analyzed by RT-PCR and Western-blot assays, as well as by fluorescence microscopy. Finally, with the aim of analyzing the correct assembly of the generated recombinant VNPs in a next step, we optimize an efficient protocol for the purification of TEV viral particles, which can be observed by transmission electron microscopy. These recombinant VNPs presenting one or more proteins of interest on their surface, are a novel biotechnological tool with potential applications in medicine, such as their use as vaccines, biosensors, or cell imaging.

**Key words:** nanoparticles; VNP; viral vectors; tobacco etch virus; potato virus X; fluorescent proteins

# ÍNDICE

ABSTRACT .....	4
INTRODUCCIÓN.....	6
1. Molecular Farming.....	6
2. Las plantas como biofactorías .....	7
3. Métodos de transformación de plantas.....	9
4. Nanopartículas virales (VNPs y VLPs).....	11
5. Virus del grabado del tabaco.....	15
OBJETIVOS .....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
1. Generación fragmentos de DNA de interés mediante PCR.....	19
2. Electroforesis en gel de agarosa .....	19
3. Elución de ácidos nucleicos a partir de gel de agarosa .....	20
4. Ensamblaje Gibson.....	20
5. Purificación de ácidos nucleicos a partir de una solución líquida .....	21
6. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	21
7. Minipreparación de plásmidos.....	21
8. Secuenciación de plásmidos y análisis .....	22
9. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .....	22
10. Agroinfiltración de plantas.....	22
11. Extracción de RNA de plantas infectadas .....	23
12. Retrotranscripción (RT) del RNA y amplificación de cDNA por PCR.....	23
13. Extracción de proteínas .....	24
14. Electroforesis en gel de acrilamida para proteínas .....	24
15. Electrotransferencia .....	25
16. Detección con anticuerpos por Western-blot.....	25
17. Tinción de geles de proteínas con azul de Coomassie.....	26
18. Purificación de partículas virales.....	26
19. Microscopía electrónica de transferencia (TEM).....	26
20. Microscopía óptica de fluorescencia .....	27
21. Condiciones de crecimiento de las plantas .....	27
RESULTADOS.....	28
1. Producción de nanopartículas de TEV fluorescentes.....	28
2. PVX como vector de expresión de proteínas de la cápside de TEV.....	33
3. PVX como vector de expresión de proteínas de la cápside de TEV fluorescentes.....	35
4. Coinfección de <i>N. benthamiana</i> con dos vectores virales basados en PVX y TEV para la producción de nanopartículas de TEV híbridas que presentan dos proteínas fluorescentes en su superficie.....	37
5. Optimización del proceso de purificación de viriones de TEV .....	41
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	54

# INTRODUCCIÓN

## 1. Molecular Farming

Desde el comienzo de la humanidad, tanto las plantas como los seres humanos han interactuado entre sí en busca del beneficio propio, lo que ha permitido su evolución hasta lo que conocemos actualmente. Los primeros homínidos que habitaron el planeta fueron nómadas que necesitaban buscar alimentos y productos de interés nutricional para su supervivencia, que encontraron en frutos, semillas, raíces u otros animales presentes en la vegetación y la fauna de la zona. Gracias a la evolución y la necesidad de obtener fuentes de nutrientes estables en el tiempo de una manera rápida y sencilla, los homínidos fueron capaces de desarrollar la agricultura, uno de los grandes hitos de la historia de la humanidad, que dio lugar al sedentarismo.

A partir de ese momento, la humanidad fue capaz de domesticar una inmensa cantidad de plantas silvestres a lo largo de cientos de generaciones, rigiéndose fundamentalmente en criterios productivos, organolépticos o de adaptación, obteniendo como consecuencia una gran variabilidad de plantas con infinidad de aplicaciones; tanto nutricionales como médicas o arquitectónicas, entre otras. Sin embargo, fueron el desarrollo tecnológico, el empleo del método científico y los conocimientos adquiridos respecto a las bases moleculares de la mejora vegetal los que han permitido que se desarrollara una agricultura extensiva de calidad, capaz de satisfacer la demanda nutricional y permitiendo que gran parte de la sociedad pudiese focalizar sus esfuerzos en otros campos, sin tener que preocuparse por sobrevivir, como ocurría en épocas pasadas.

Uno de los nuevos retos a los que se enfrenta la sociedad actual, y en concreto los científicos, es satisfacer la demanda de moléculas de interés farmacéutico o industrial. A esto se lo conoce como *molecular farming*, el cual puede definirse como “la producción, en células transformadas o en organismos transgénicos, de proteínas recombinantes con potencial terapéutico o de interés comercial” (Twyman et al., 2003). El *molecular farming* comenzó en los años 80s, cuando se sintetizaron las primeras proteínas recombinantes humanas tales como la insulina (D. v. Goeddel et al., 1979) o la hormona de crecimiento (D. v. Goeddel et al., 1979) en la bacteria *Escherichia coli*. Desde ese momento, una gran variedad de sistemas de expresión de moléculas de interés han sido exploradas, incluyendo otros tipos de bacterias, levaduras y hongos, células animales y vegetales en cultivos y hasta plantas o animales transgénicos.

Los sistemas basados en bacterias tales como *Escherichia coli* han sido los primeros en usarse y siguen siendo unos de los más empleados en la actualidad debido a su bajo coste de mantenimiento, alto rendimiento, su alta tasa de división celular y su sencilla manipulación genética. Sin embargo, una de sus principales desventajas es que no poseen chaperonas eucariotas, lo cual puede impedir el correcto

plegamiento de las proteínas, afectando así a su solubilidad y su posterior purificación. Por otro lado, la diferencia en las modificaciones postraduccionales como la glicosilación también puede afectar el correcto funcionamiento de muchas proteínas de interés, así como generar una respuesta inmune en humanos en caso de usarse con fines terapéuticos (Merlin et al., 2014).

En cuanto a los sistemas basados en levaduras, destacan *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Ésta última presenta una gran ventaja basada en su capacidad de usar metanol como fuente de carbono, característica que lo hace prácticamente única en el reino de los hongos. Esta cualidad, junto a una gran capacidad de recombinación homóloga y una alta tasa de división que ambas poseen, las convierten en valiosos candidatos como sistema de expresión de moléculas de interés, siendo incluso reconocidas por la *Food and Drug Administration* de EEUU (FDA) como bioseguras (GRAS; *generally recognized as safe*). Además de lo mencionado, cabe destacar que, si bien tanto los sistemas eucariotas basados en levaduras como en células de insectos son capaces de realizar modificaciones postraduccionales, los patrones de glicosilación pueden variar considerablemente a los encontrados en mamíferos. Eso hace que los sistemas basados en cultivos de células de mamíferos como las células de ovario de hámster chino (CHO) y los animales transgénicos sean los sistemas óptimos para conseguir proteínas bien plegadas y con las modificaciones postraduccionales correctas, aunque son claramente más costosas de producir y de escalar su producción.

## **2. Las plantas como biofactorías**

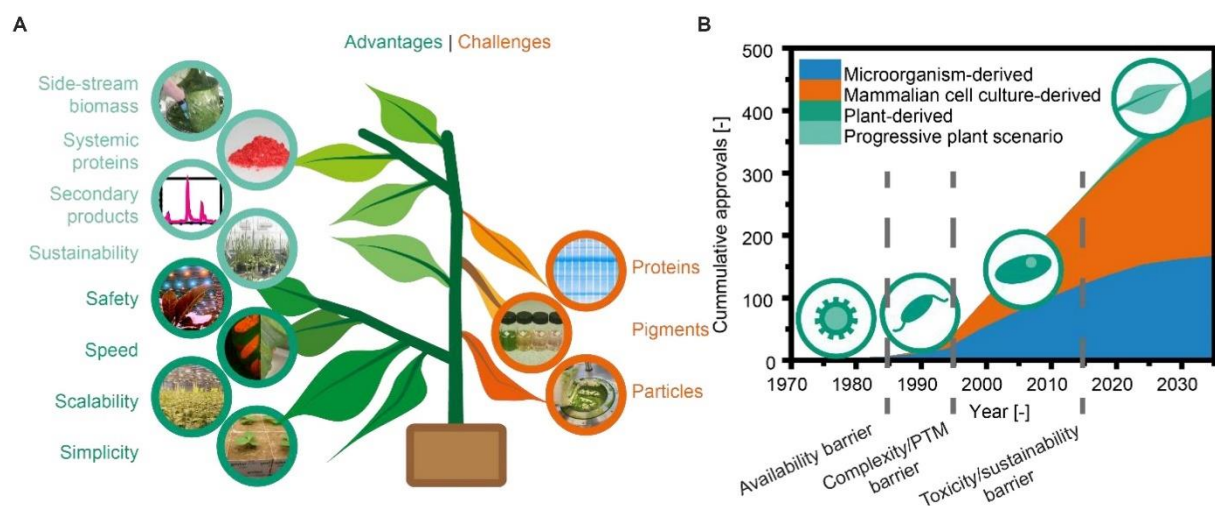
Una posible alternativa a los sistemas anteriormente descritos es el empleo de plantas o células vegetales para obtener de manera sencilla y escalable productos biológicos de interés para la sociedad. Debido a su origen acuático, en condiciones de baja luminosidad y baja concentración de CO<sub>2</sub>, las células vegetales han sido seleccionadas evolutivamente para producir altos rendimientos de compuestos con bajo coste energético, desarrollando de esta forma procesos metabólicos muy eficientes, necesarios para poder sobrevivir en ambientes tan restrictivos. Sin embargo, cuando las plantas colonizaron tierra firme se encontraron en una situación de superproducción de carbono reducido debido a la alta eficiencia de procesos como la fotosíntesis, conociéndose esto como la hipótesis de la *capacity surplus*. En consecuencia, las plantas desarrollaron hábitos análogos a los encontrados en sociedades ricas, tales como el vertimiento de recursos, una gran diversidad de estilos de vida, el consumo notorio o adquiriendo una actitud complaciente frente a parásitos oportunistas (Thomas and Sadras, 2001). Al tener asegurada su principal fuente de carbono, las plantas han desarrollado un variado y complejo metabolismo secundario. Gracias a estos motivos, las plantas pueden ser utilizadas como biofactorías, empleando el excedente de carbono y la gran variabilidad metabólica y enzimática con el fin de obtener productos de interés.

Las plantas tienen interesantes ventajas sobre otros sistemas de expresión de proteínas recombinantes (**Figura 1**), convirtiéndolas en un atractivo sistema de *molecular farming* (Buyel, 2019). Al contrario que los microorganismos, las plantas poseen un mecanismo de síntesis de proteínas y modificaciones postraduccionales similares a las presentes en animales (Strasser, 2016), convirtiendo los sistemas basados en plantas en superiores a los sistemas procarióticos para la expresión de proteínas complejas tales como anticuerpos o proteínas de membrana (He et al., 2014). Si bien se han encontrado ciertas diferencias en los patrones de glicosilación, destacando principalmente la presencia de xilosas y fucosas que no se encuentran presentes en mamíferos, hasta la fecha no se ha mostrado ningún tipo de rechazo inmunogénico al emplearlas en humanos ni se ha visto que afecten a la funcionalidad de la proteína recombinante, observándose incluso casos en los que mejora su actividad enzimática (Grabowski et al., 2014). A pesar de ello, estas diferencias pueden dificultar la comercialización de proteínas recombinantes producidas en plantas, ya que alrededor del 50% de las proteínas humanas están glicosiladas y alrededor del 70% de las proteínas aprobadas para fines terapéuticos también lo están. Esto ha generado que muchos científicos abordaran el desafío de “humanizar” este patrón de glicosilación (Hanania et al., 2017; Jansing et al., 2019; Schähls et al., 2007; Sriraman et al., 2004). Otra posible ventaja es la producción de proteínas que no se pueden sintetizar en células animales u otras células eucariotas, debido a su toxicidad o a su compleja estructura, como por ejemplo el *viscumin*, una lectina con actividad anticancerígena (Gengenbach et al., 2019). Por otro lado, los niveles de expresión de proteínas recombinantes en plantas comparado con otros sistemas son favorables, llegándose a alcanzar niveles de expresión por encima de 2 g/kg (Zischewski et al., 2016). Esto, combinado con la facilidad y simplicidad para cultivarlas en ambientes no estériles (Sack et al., 2015) y su bajo coste (Buyel and Fischer, 2012), hacen que su cultivo sea fácilmente escalable a nivel agronómico, simplemente aumentando el número de plantas, al contrario que en sistemas basados en células animales, donde se aumentan los costes derivados de los medios de cultivo y fermentadores, o en sistemas basados en animales transgénicos, donde aumentan los costes de mantenimiento, alimentación y cuidados veterinarios de los animales. Además de las mencionadas, una de las ventajas más importantes es que las plantas no portan ningún agente peligroso para los humanos, ya que no se han descrito priones y los virus que porta no se transmiten a mamíferos, convirtiéndolas en bioseguras. Finalmente, una ventaja adicional es la rapidez con la cual estas proteínas recombinantes pueden ser obtenidas, lo que puede conseguirse en unas pocas semanas (Shoji et al., 2012). Esta rápida producción puede permitir una respuesta inmediata frente a epidemias o pandemias, como se demostró con la producción de un cocktail de anticuerpos contra el Ébola (Qiu et al., 2014) o el desarrollo de vacunas contra el SARS-CoV-2 en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Ward et al., 2021). A pesar de todas las ventajas que presentan las plantas para la producción de proteínas recombinantes, el aspecto más complejo y costoso del proceso es la purificación, siendo más de un 80% de los gastos totales del proceso (F. Buyel, 2015). Las principales causas que aumentan este coste son: la gran cantidad de metabolitos primarios presentes en



las plantas, lo cual requiere de procesos de clarificación; la enorme cantidad de proteínas propias de la planta que necesitan ser separadas del producto de interés; y la presencia de metabolitos secundarios vegetales, tales como pigmentos y fenoles, que pueden adherirse permanentemente al producto y alterar su funcionalidad. Sin embargo, actualmente se están desarrollando tecnologías libres de purificación, como por ejemplo las basadas en “rhizosecreción” (Madeira et al., 2016b, 2016a), que consiste en la liberación de las proteínas recombinantes a través de las raíces adventicias o también llamadas *hairy roots* generadas debido a la acción de *Agrobacterium rhizogenes*.

Otra desventaja importante surge en los casos en que las plantas utilizadas sean transgénicas, lo cual las convierte en plantas sometidas a rigurosas regulaciones y controles, ya que su siembra en campo sin control es ilegal por su potencial y controvertida amenaza para la biodiversidad. Este hecho supone una gran desventaja frente a otros sistemas, como los basados en células animales o procariontas, cuyas regulaciones pueden llegar a ser menos exigentes en comparación. En conclusión, si bien aún quedan grandes desafíos por resolver, es difícil discutir el gran potencial que presentan las plantas como sistemas de expresión de biomoléculas y proteínas recombinantes.



**Figura 1.** Descripción general de los sistemas de expresión basados en plantas. **(A)** Ventajas y retos futuros del uso de plantas en *molecular farming*. **(B)** Productos biofarmacéuticos basados en proteínas recombinantes aprobados hasta la actualidad y su pronóstico en el futuro. Tomada de (Buyel, 2019).

### 3. Métodos de transformación de plantas

Con el objetivo de producir moléculas de interés en plantas, es necesario introducir material genético exógeno en el interior de las células vegetales existiendo esencialmente tres métodos posibles. El primer método (y más empleado en la actualidad) se basa en el uso del patógeno *Agrobacterium tumefaciens*, el cual puede transferir de manera natural pequeños fragmentos de DNA presentes en un plásmido que porta (plásmido Ti) al genoma de la planta. Este sistema natural de infección puede emplearse para introducir un DNA de interés gracias a técnicas de ingeniería genética, las cuales permiten sustituir el DNA bacteriano (T-DNA) por un DNA exógeno a elección; permitiendo así la

expresión de dicho gen en el genoma de la planta y produciendo como consecuencia la proteína de interés. El segundo método consiste en la transferencia directa de DNA en el interior celular a través de diferentes técnicas que fuerzan el DNA a atravesar la pared celular y/o la membrana plasmática. Algunas de estas técnicas son el bombardeo de partículas (conocido como biolística), la electroporación o la transformación de protoplastos mediado por polietilenglicol (PEG). El tercer y último método se basa en la habilidad innata que poseen los virus de plantas de penetrar las células vegetales y transportar ácidos nucleicos a su interior. El genoma de los virus de plantas puede ser modificado por ingeniería genética para contener genes exógenos, permitiendo que durante la infección viral se produzcan las proteínas recombinantes de interés de manera transitoria y sistémica en toda la planta sin la necesidad de generar una planta transgénica en el proceso. Además, como son patógenos naturales de plantas, poseen supresores virales que inhiben el silenciamiento del RNA, permitiendo así que se puedan producir proteínas en una mayor cantidad (Li and Wang, 2019).

Este último método fue creado y popularizado por la empresa alemana ICON GENETICS (Gleba et al., 2007, 2013) debido principalmente a los altos rendimientos conseguidos (alcanzando hasta unos niveles de expresión de hasta un 45% de la proteína soluble total) y debido a la rapidez de obtención de proteínas recombinantes en comparación con la transformación estable de plantas mediada por *A. tumefaciens* (Marillonnet et al., 2005, 2004). Con este método, se han conseguido generar vacunas personalizadas contra el linfoma de Hodgkin (Bendandi et al., 2010), producir anticuerpos IgG humanos (Giritch et al., 2006) o la hormona del crecimiento humana (Gils et al., 2005), entre otros. Sin embargo, este método presenta dos problemas principalmente: (i) su capacidad, ya que hay una limitación del tamaño del inserto de DNA que se puede introducir en el vector vírico, dificultando la producción de varias proteínas de manera simultánea; y (ii) la bioseguridad, ya que, a pesar de ser inocuos para los seres humanos, existe la posibilidad de que los virus modificados infecten otras especies susceptibles de la zona.

Alrededor del uso de vectores virales derivados de plantas se ha desarrollado una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas en campos muy diversos como la agricultura o la medicina (Abrahamian et al., 2020). Entre ellas, destacan su uso para silenciar genes endógenos de plantas (**VIGS**, *virus-induced gene silencing*) con el objetivo de determinar la función de un gen mediante genética reversa o generar resistencia frente a patógenos (Hajeri et al., 2014) o plagas (Bao et al., 2016); su uso para editar genes (**VIGE**, *virus-induced gene editing*) mediante la coexpresión de guías (sgRNAs) junto a una nucleasa Cas o expresándolas en plantas transgénicas que las produzcan (Uranga et al., 2021a), la **producción de proteínas** con fines terapéuticos antimicrobianos (Kovalskaya et al., 2019) o de inducción de la floración (McGarry et al., 2017). Además, en la última década ha aumentado considerablemente el interés del uso de virus en el campo de la nanotecnología.

#### 4. Nanopartículas virales (VNPs y VLPs)

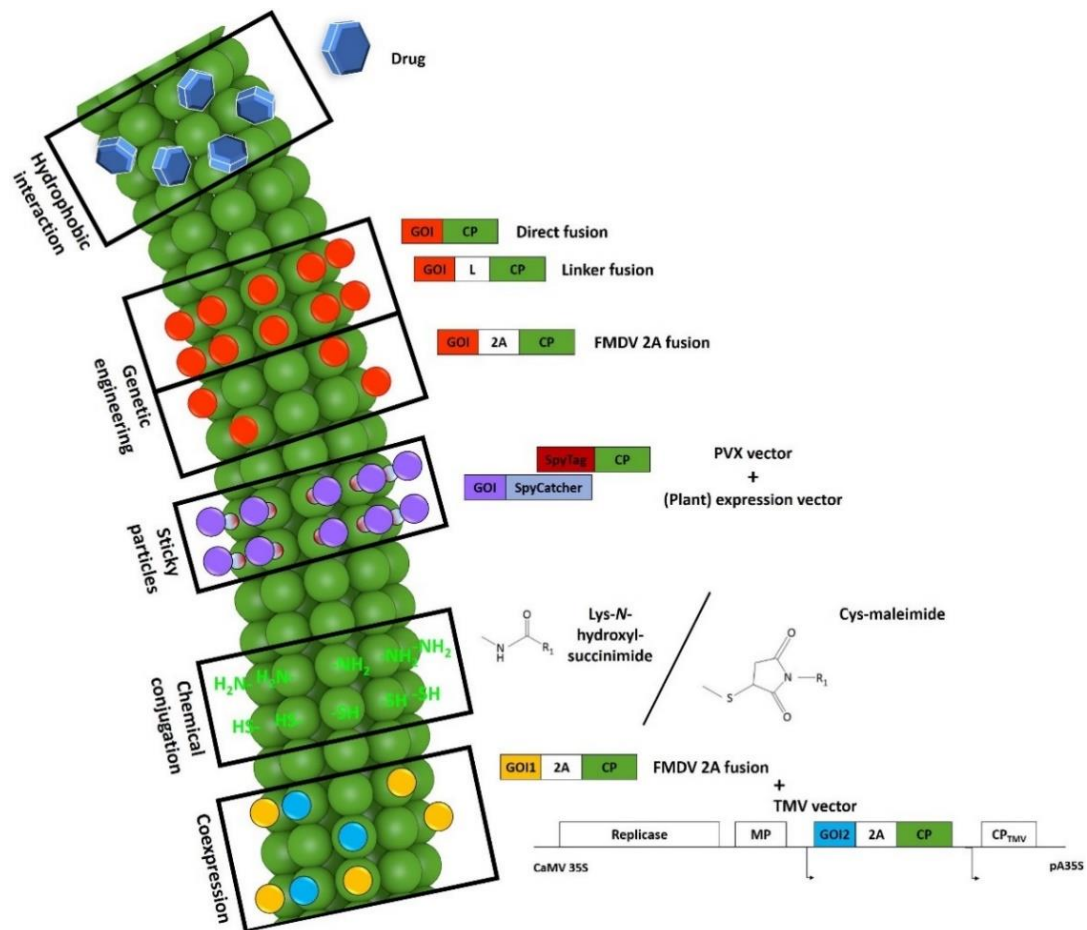
Las nanopartículas virales o VNPs (*virus nanoparticles*) son complejos nanométricos autoensamblables que se asemejan en tamaño y forma al virus del cual proceden. La aplicación y desarrollo de las VNPs y de sus versiones libres de genoma, las partículas similares a virus o VLPs, ha crecido rápidamente en campos como la medicina, la industria farmacéutica o los nanomateriales, debido a las características biológicas deseables que se atribuyen a la estructura viral de las partículas (Grgacic and Anderson, 2006). La generación de la primera VNP fue descrita en 1955 con la reconstitución in vitro del virus del mosaico del tabaco (TMV) gracias al autoensamblado de sus proteínas de la cápside (CP) (Fraenkel-Conrat and Williams, 1955).

Las plataformas de expresión de VNPs se clasifican principalmente en función del huésped que infecta el virus en el que está basado (Charlton Hume et al., 2019). Debido a esto, podemos clasificar las nanopartículas virales según si se derivan de virus de origen animal, vegetal o bacteriano. Dentro de las VNPs basadas en bacteriófagos podemos destacar el uso de bacteriófagos de RNA de la familia *Leviridae*, tales como MS2, PP7, AP205 o Q $\beta$ , los cuales presentan una estructura icosaédrica formada por 90 homodímeros de CP que se ensamblan junto al RNA genómico (O'Rourke et al., 2015). Sus propiedades estructurales han permitido su uso como “*scaffold*” para presentar antígenos (Jegerlehner et al., 2013; Pastori et al., 2012) y para liberar adyuvantes de vacunas (Storni et al., 2004). Por otro lado, las VNPs basadas en virus animales destacan por ser envueltas por una bicapa lipídica, lo cual permite la presentación de antígenos que requieren estar asociados a membrana y lo asemeja más a la mayoría de virus que infectan a humanos. Esto los convierte en perfectas herramientas para ser usadas como vacunas, como por ejemplo contra el virus del Dengue (Harahap-Carrillo et al., 2015) o la gripe (Pushko et al., 2017). Por último, las nanopartículas derivadas de virus de origen vegetal han generado un gran interés recientemente debido a características como su sencillez, fácil modificación y purificación, la falta de membranas lipídicas y sus estructuras definidas basadas en el ensamblaje de repeticiones de una o dos proteínas de la cápside. Además, los virus de plantas no son infecciosos en animales o humanos y poseen características fisicoquímicas de gran interés, como por ejemplo un amplio rango de estabilidad frente a temperatura, pH, sal, agentes químicos o proteasas. Otra ventaja que presenta frente a otras plataformas es la gran variabilidad de formas, estructuras y tamaños disponibles, debido a la diversidad de virus de plantas que se encuentran en la naturaleza. Entre ellos, destacan los virus con forma esférica, tales como el virus del mosaico del caupí (CPMV), virus del moteado clorótico del caupí (CCMV) o el virus del mosaico del bromo (BMV), los cuales son icosaédricos y difieren en tamaño y número de CPs empleadas en su ensamblaje; o los que presentan forma alargada, sea esta rígida (como el caso de TMV) o flexible (como el caso del virus X de la patata, PVX). Estas propiedades convierten a los virus de plantas en plataformas ideales para la generación de VNPs con una gran espectro de posibles aplicaciones en nanotecnología (Zhang et al., 2018).

Los métodos de modificación de partículas virales mediante ingeniería genética son actualmente los más usados cuando el objetivo es presentar secuencias aminoacídicas de pequeño o mediano tamaño (Röder et al., 2019). Las partículas virales recombinantes son creadas generalmente al unir directamente la secuencia nucleotídica de interés en el marco de lectura del extremo 5' del gen *cp*. Dichas proteínas insertadas están limitadas en tamaño, ya que deben permitir el correcto ensamblaje y la funcionalidad del virus, al igual que mantener sus propiedades fisicoquímicas. Algunas posibles soluciones son la adición de secuencias espaciadoras (*linkers*) que aportan flexibilidad como en el caso de *linkers* ricos en glicinas/serinas (Lauria et al., 2017) o que ajustan el punto isoeléctrico (pI) como en el caso del péptido DEADDAED (Röder et al., 2017b). Por otro lado, el ensamblaje de proteínas de mayor tamaño puede facilitarse mediante la mezcla de CPs recombinantes y CPs sin modificar, evitando así posibles impedimentos estéricos entre los capsómeros ensamblados. Esto puede conseguirse introduciendo la secuencia F2A procedente del *foot-and-mouth disease virus* (FMDV), la cual se inserta entre el extremo 3' de la secuencia insertada y el extremo 5' de la CP, dando como resultado una población mixta de proteínas de tipo salvaje y modificadas a través de un mecanismo de salto ribosómico.

Otra alternativa frente a las limitaciones relacionadas con el tamaño y la estabilidad de las secuencias insertadas es a través del sistema SpyTag/SpyCatcher (ST/SC; Röder et al., 2017). Como se puede observar en la **Figura 2**, se generan VNPs que presentan el epítipo ST y la proteína de interés fusionada al epítipo SC, los cuales se pueden unir covalentemente, de forma irreversible y específica *in vitro*.

Por otro lado, otro método de obtención de VNPs recombinantes es usando métodos químicos. Destacan principalmente dos: por interacciones hidrofóbicas (Le et al., 2017a), sea con una molécula de origen proteico o no; o por conjugación química usando los sistemas lisina-N-hidroxisucinamida / cisteína-maleimida (Le et al., 2017b). Sin embargo, estos métodos son muy poco empleados ya que necesitan un exceso molar de hasta 1000 veces para la unión, tiempos de reacción muy largos y eficiencias que van desde el 21 al 86% según el tipo de conjugación y el tamaño de la molécula diana (Venter et al., 2011).



**Figura 2.** Representación esquemática de los diversos métodos de modificación de la superficie viral para la producción de VNPs. Tomado de (Röder et al., 2019).

Como se ha mencionado anteriormente, las nanopartículas virales derivadas de plantas poseen un gran abanico de aplicaciones a nivel industrial y clínico (**Figura 3**). Entre ellas destacan:

**1. Nanoreactores:** el uso de VNPs como nanoreactores permite la compartimentalización de reacciones enzimáticas a escala nanométrica, asemejándose a las reacciones en la naturaleza. Por ejemplo, uno de los virus más empleados en este campo es el CCMV (Comellas-Aragonès et al., 2007; de Ruiter et al., 2018).

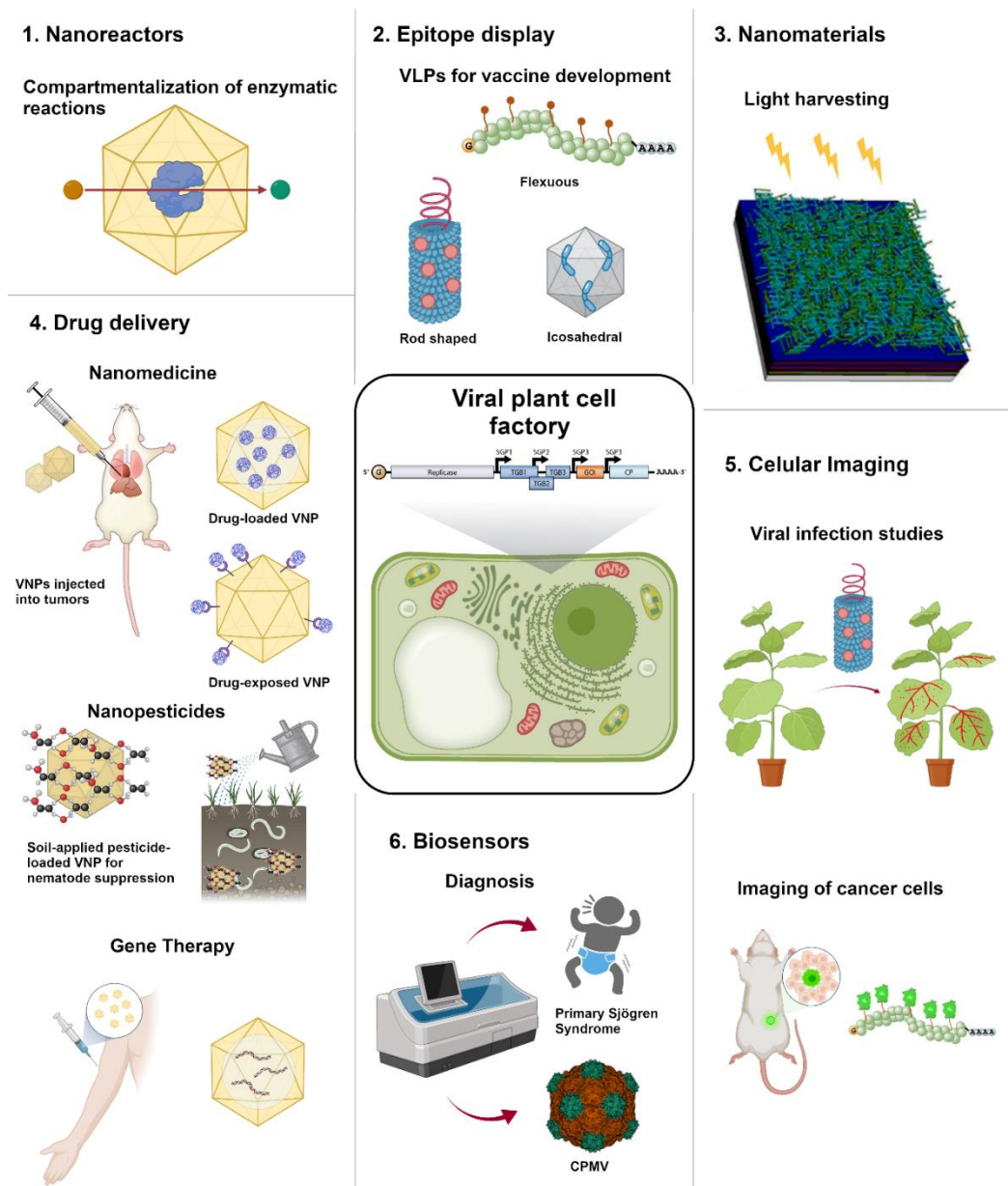
**2. Presentación de antígenos:** la principal aplicación es la generación de VNPs para el desarrollo de potenciales vacunas. Algunos ejemplos han sido descritos anteriormente, aunque el más actual es el desarrollo de una vacuna contra el SARS-CoV-2, la cual se encuentra ahora en Fase 3 (Gobeil et al., 2021).

**3. Nanomateriales:** debido a sus estructuras simétricas, diferentes VNPs tales como TMV, CPMV o BMV pueden formar estructuras superiores que pueden utilizarse por ejemplo como complejos de captación de luz (Miller et al., 2007).

**4. Entrega de moléculas:** ya sean contenidas en el interior de las VNPs o expuestas en su superficie, la liberación de diferentes compuestos tiene muchas aplicaciones en medicina, tanto en terapia génica liberando DNA (Ferrer-Miralles et al., 2015) como en tratamientos anticancerígenos (Lebel et al., 2016). También se ha propuesto su uso con fines agrícolas liberando pesticidas (Chariou et al., 2019).

**5. Marcaje celular:** El uso de VNPs que expresen proteínas fluorescentes se puede usar para estudiar la infección viral (Barón et al., 2016) o para marcar células cancerosas (Shukla et al., 2014), entre otras.

**6. Biosensores:** Aplicados principalmente al desarrollo y optimización de métodos de detección como por ejemplo de la detección de anticuerpos (Uhde-Holzem et al., 2016) o el diagnóstico del Síndrome de Sjögren (Tinazzi et al., 2015).



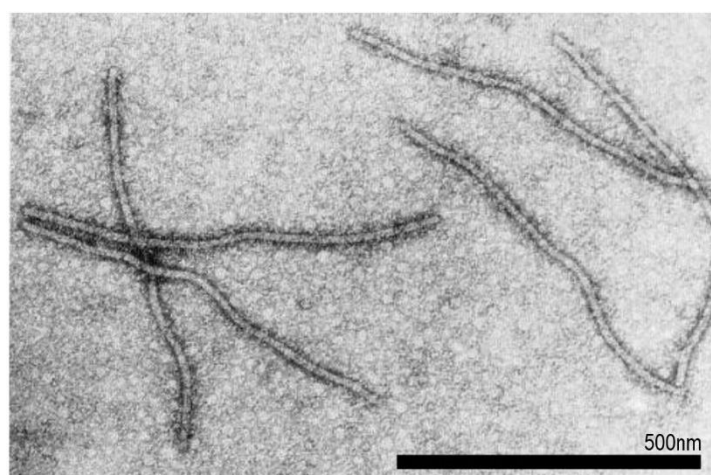
**Figura 3.** Representación esquemática de las principales aplicaciones de nanopartículas virales derivadas de plantas.

## 5. Virus del grabado del tabaco

El virus del grabado del tabaco (TEV por sus siglas en inglés de *Tobacco etch virus*) es un virus vegetal perteneciente al género *Potyvirus* de la familia Potyviridae. Los miembros de este género destacan por ser transmitidos por áfidos a través del estilete de manera no persistente, tener una morfología alargada y producir un moteado en forma de mosaico en los huéspedes que infecta (Revers and García, 2015). La primera vez que se reportó este virus fue en 1928 en Kentucky, EE. UU. (Valleau and Johnson, 1928) y, desde entonces, se han encontrado otras variantes más agresivas (EM Johnson, 1930) y otras más tenues (Bawden and Kassanis, 1941), en cuanto a síntomas se refiere.

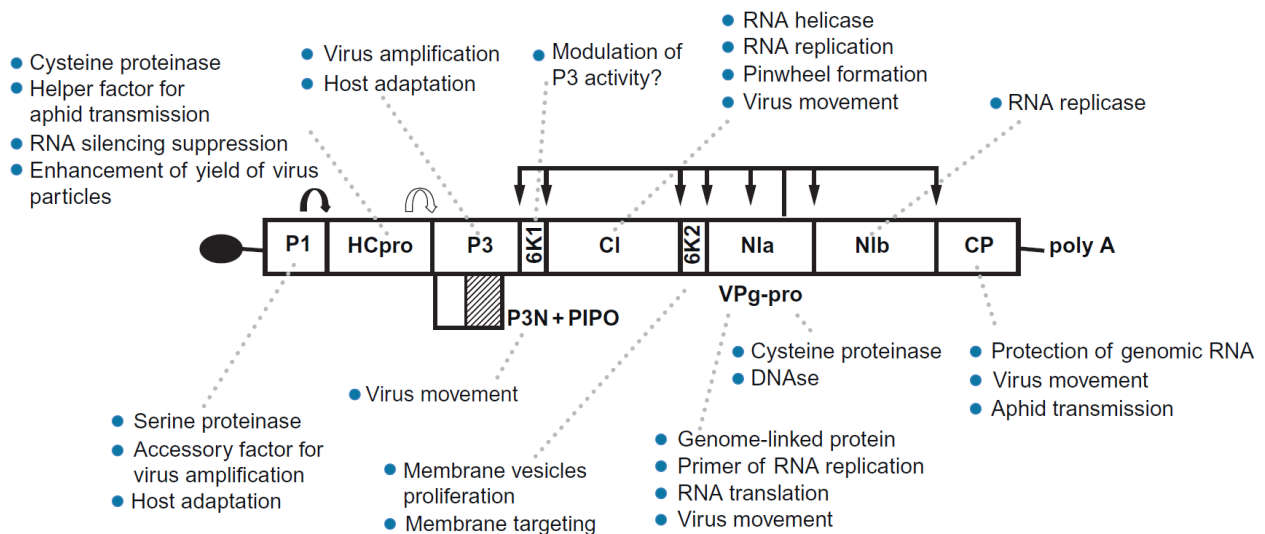
TEV parece ser un virus que ha evolucionado en el continente americano, ya que ha sido reportado tanto en Norte América, destacando en Canadá, Estados Unidos, México y Puerto Rico; hasta en América del Sur, destacando Venezuela (Gibbs and Ohshima, 2010). Se ha observado que sus huéspedes son principalmente dicotiledóneas, afectando concretamente a más de 120 especies en 19 familias diferentes. Entre los cultivos más relevantes desde el punto de vista agrícola, se incluyen varias especies del género *Nicotiana*, *Solanum* y *Capsicum* (<https://www.dpvweb.net/>). Sin embargo, también se ha observado como algunas especies de hierbas perennes pueden actuar como reservorios del virus, entre las que se incluyen *Solanum nigrum*, *Chenopodium album*, *Datura stramonium* o el género *Physalis* (Breman, 1987). Sus síntomas varían según la planta que infecta, destacando el empalidecimiento de las venas y la aparición de moteado y líneas necróticas de grabado en las hojas. Además, las hojas y frutos pueden volverse atrofiadas.

En cuanto a su estructura, se ha observado por microscopía electrónica (**Figura 4**) que forma una partícula de aproximadamente 730 nm de longitud y unos 12-13 nm de diámetro, el cual contiene un genoma de RNA de cadena simple positiva (+) de unos 9.5 kb.



**Figura 4.** Imagen del TEV obtenida por microscopía electrónica. Tomada de (Hiebert et al., 1971).

Dicho genoma consiste en un ssRNA (+) monocatenario, el cual contiene un único marco abierto de lectura (ORF) que codifica una gran poliproteína que es proteolíticamente procesada posteriormente a su síntesis por proteasas codificadas por el propio virus (Revers and García, 2015). Además, el genoma está flanqueado en su extremo 5' por una región no codificante con una proteína terminal (VPg) asociada; y en su extremo 3' por una región no codificante seguida de una cola de poliadeninas de longitud variable. La región central de la poliproteína se encuentra conservada en el género *Potyvirus* y codifica para las proteínas maduras P1-HCPro-P3-6K1-CI-6K2-VPg-NIaPro-NIb-CP, las cuales se producen de forma equimolar (Bedoya et al., 2010a) y poseen una gran variedad de funciones descritas en la **Figura 5** y que se desarrollarán posteriormente. Además, se produce P3N-PIPO mediante un mecanismo de deslizamiento transcripcional.



**Figura 5.** Representación esquemática del genoma de los *Potyvirus*, junto a las características relevantes y funciones propuestas de sus proteínas. Tomada de Revers et al., 2015.

Con el objetivo de infectar toda la planta, el virus o sus componentes deben moverse en el interior celular para establecer el sitio de infección, multiplicarse y finalmente posicionar el movimiento hacia la nueva célula a infectar. Sin embargo, la replicación y el movimiento intercelular están claramente ligados, dándose prácticamente de manera simultánea. Se ha observado que el proceso de replicación está ampliamente conservado en los *Potyvirus* y está basado en la formación de vesículas que actúan como sitios de replicación viral (Cotton et al., 2009). Se ha observado que dichos sitios de replicación están basados en la unión de la proteína 6K2 junto con NIa, los cuales forman vesículas citoplasmáticas distribuidas a lo largo de la membrana cortical y perinuclear del retículo endoplasmático (ER). Concretamente, diferentes estudios han observado que se encuentran en las zonas de salida del ER, las cuales son dominios de exportación del ER y que están asociados con el aparato de Golgi (Lerich et al., 2011). Además de esto, se ha visto que estas vesículas también interactúan con los cloroplastos, lo cual sugiere que éstos también son sitios de replicación viral junto a los observados en el ER. Durante los



últimos años, P3, CI, CI-6K2, 6K2-NIa, NIaPro y NIb han sido identificados como componentes de las vesículas de replicación viral de los *Potyvirus*. El complejo de replicación contiene a la NIb como una RNA polimerasa, CI como RNA helicasa, VPg y NIa unidos al extremo 5' del RNA viral e interaccionando con NIb para iniciar la replicación y con 6K2 como anclaje a membrana. P3 y 6K1 también parecen ser esenciales para la multiplicación del virus, pero no se ha demostrado aún su función, aunque si su presencia en los sitios de replicación. El rol de la HCPro en la multiplicación viral está asociada a su actividad como supresor del silenciamiento del RNA, ya que se encarga de la protección de los intermediarios replicativos y del RNA viral sin encapsidar. Estos complejos replicativos son móviles en las células, moviéndose a lo largo de los microfilamentos de actina con la ayuda de la miosina y también intercelularmente a través de los plasmodesmos con el objetivo de infectar las células vecinas. Este proceso de transferencia del genoma viral de una célula a otra a través de los plasmodesmos se lleva a cabo gracias a la acción principalmente de las proteínas CI y CP, en la cual la CI actúa posicionando los viriones para su traslocación a través de la pared celular.

Tras infectar las células vecinas, TEV es capaz de establecer una infección sistémica en toda la planta y para ello requiere moverse largas distancias. Aunque este proceso no está ampliamente descrito, se conoce que dicho movimiento se hace en forma de viriones de estructuras filamentosas formadas por la interacción de una gran cantidad de proteínas CP alrededor del genoma viral. Tanto el extremo N-terminal como el C-terminal de la CP se ha demostrado que son prescindibles para la encapsidación del genoma del virus, pero indispensables para el movimiento de grandes distancias (Carbonell et al., 2013). Además, muchos estudios han demostrado la necesidad de VPg para el movimiento de grandes distancias del virus en el interior de la planta (Schaad et al., 1997).

Hasta el momento, el uso de TEV en biotecnología radica principalmente en su rol como vector de expresión de proteínas recombinantes en plantas (Martí et al., 2020; Ueda et al., 2008), debido a que la naturaleza alargada de los viriones permite la acomodación de grandes cantidades de material genético exógeno. Gracias a esto, se ha conseguido expresar diferentes proteínas recombinantes (Bedoya et al., 2010a, 2012; Cordero et al., 2018; Martí et al., 2020) e incluso introducir rutas biosintéticas completas (Majer et al., 2017). Además, también se ha empleado como virus para inducir la edición genética de plantas (Uranga et al., 2021c). Finalmente, si bien han sido reportados ensamblajes in vitro de viriones de TEV (Zapata-Cuellar et al., 2021), todavía no se ha descrito la generación de VNPs derivadas de TEV como andamio (*scaffold*) para presentar antígenos u otras proteínas de interés genéticamente codificados en plantas.

En este Trabajo de Fin de Máster se pretende desarrollar por primera vez, de manera novedosa, la generación de nanopartículas virales de TEV que presenten proteínas de interés en su superficie; usando en este caso las proteínas fluorescentes GFP y mCherry. Además, se pretende generar nanopartículas de TEV híbridas, capaces de presentar dos proteínas diferentes en la superficie mediante el empleo de un

sistema que consiste en la coinfección con dos vectores virales basados en PVX y TEV. Finalmente, con el objetivo final de demostrar la presencia de las proteínas fusionadas en la superficie del virión por microscopía electrónica, se pretende poner a punto el proceso de purificación de partículas virales de TEV.

## **OBJETIVOS**

1. Diseño y construcción de vectores virales basados en TEV para la producción de nanopartículas virales que presenten en su superficie proteínas fluorescentes.
2. Análisis de la capacidad infectiva de los clones virales recombinantes y la presencia de la proteína de interés en la progenie viral.
3. Desarrollo de un sistema de producción de nanopartículas virales de TEV híbridas que presenten dos polipéptidos diferentes en la superficie mediante la combinación de dos sistemas virales.
4. Optimización del proceso de purificación de partículas virales de TEV.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Generación fragmentos de DNA de interés mediante PCR

Todas las reacciones de PCR para clonados se llevaron a cabo empleando la polimerasa de alta fidelidad *Phusion* (Thermo Scientific), la cual presenta una baja tasa de error ( $4.4 \times 10^{-7}$ ). Por cada reacción de PCR, se emplearon 20  $\mu$ l de mezcla; la cual consistía en: 4  $\mu$ l de tampón HF (Thermo Scientific), 0.6  $\mu$ l de DMSO, 0.4  $\mu$ l de dNTPs (10 mM), 0.4  $\mu$ l del cebador *forward* (25  $\mu$ M), 0.4  $\mu$ l de cebador *reverse* (25  $\mu$ M), 0.2  $\mu$ l de la DNA polimerasa *Phusion* (2 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l del DNA usado como molde y completando hasta 20  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O mili-Q. Los cebadores utilizados en este trabajo junto a su utilización se encuentran detalladas en Material Suplementario 1. Dicha mezcla fue preparada en hielo y en condiciones para evitar contaminación gracias al empleo de puntas de filtro y una cabina de flujo laminar previamente descontaminada con luz ultravioleta. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador *Life-ECO* (BIOER Technology) siguiendo las condiciones descritas en Tabla 1.

**Tabla 1:** Programa con las condiciones a seguir para llevar a cabo las PCR (*Phusion*) en el termociclador.

Proceso		Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial		30 s	98 °C
Desnaturalización	x30 ciclos	10 s	98 °C
Hibridación		30 s	55 °C
Extensión		15 s/kb producto	72 °C
Extensión final		10 min	72 °C

## 2. Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles de agarosa (8 x 6.5 x 0.5 cm) añadiendo 25 ml de agarosa 1% fundida en TAE 1x (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM acetato de sodio) a un soporte previamente sellada a la que se le puso el peine de interés y se dejó solidificar durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez solidificada, se retiró el peine y se introdujo en una cubeta de electroforesis llena de TAE 1x. Las muestras fueron aplicadas en los pocillos generados por el peine tras mezclarse con tampón de carga x10 (12.5 mg azul bromofenol, 12.5 mg xilencianol, 1 ml 0.5 M EDTA, 28.75 g 87% glicerol, pH 8.0) con una proporción 1/10 respecto al volumen final. Además, también se añadió un marcador molecular de 1 kb (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*, Thermo Scientific) en un pocillo libre. Una vez cargadas las muestras, se corrió la electroforesis utilizando una fuente PowerPac<sup>TM</sup> Basic Power Supply (BIO-RAD) durante 35 min a 85 V.

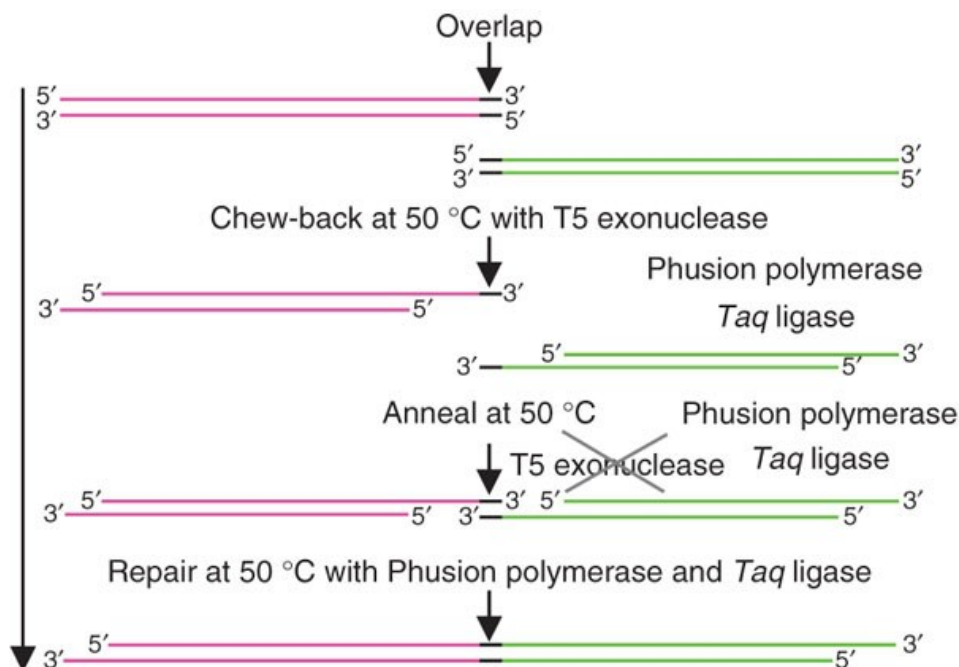
El gel se tiñó en una cubeta de plástico con 10  $\mu$ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) diluidos en 200 ml de H<sub>2</sub>O con agitación constante (125 rpm) durante 15 min. Tras ello, se descartó el bromuro de etidio en su contenedor correspondiente y se realizaron tres lavados consecutivos con agua. Finalmente, el gel se visualizó en el transiluminador (Uvitec).

### 3. Elución de ácidos nucleicos a partir de gel de agarosa

Se inició el proceso cortando la banda seleccionada del gel de agarosa lo más preciso posible y se introdujo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente, siguiendo las indicaciones del kit de purificación de ZYMO Research, se añadieron 3 volúmenes de ADB (*Agarose Dissolving Tampón*) según el peso de la banda y se incubó a 55 °C durante 5-10 min, realizando inversiones cada minuto para asegurar su completa disolución. Tras ello, la mezcla obtenida se traspasó a una columna ZYMO introducida en un tubo colector y se centrifugó durante 30 s a 13 000 rpm. Una vez finalizado, se retiró el filtrado y se procedió a realizar 2 lavados con tampón de lavado (WB). Para ello se añadieron 200 µl de WB y se centrifugó durante 30 s, descartando el filtrado al finalizar. Tras los lavados, la columna se traspasó a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml, donde se produjo la elución del DNA. Para ello, se añadieron 8-15 µl de 1X-EB (tampón de elución), se incubó durante 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 min, quedándonos con el eluido.

### 4. Ensamblaje Gibson

La unión entre el producto de PCR y el plásmido aceptor se produjo usando el método de ensamblaje Gibson (Gibson et al., 2009), el cual es un método isotérmico en el cual con una única reacción es capaz de ensamblar múltiples moléculas de DNA con extremos solapantes gracias a la acción combinada de una 5' exonucleasa, una DNA polimerasa y una DNA ligasa (**Figura 6**).



**Figura 6.** Esquema explicativo del método de Ensamblaje Gibson. Tomada de (Gibson et al., 2009)

Para ello, se mezcló en tubos Eppendorf de 0.2 ml tanto el fragmento de PCR como el plásmido linealizado (producido por PCR o por digestión con enzimas de restricción según el caso), teniendo en

cuenta que el fragmento debe estar 2-3 veces en exceso molar respecto del vector, junto con 1 volumen de *Gibson Assembly Master Mix (2x)*, perteneciente al kit *NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix* (NEB). Esta mezcla se incubó a 50 °C durante 1 h.

## **5. Purificación de ácidos nucleicos a partir de una solución líquida**

Siguiendo las indicaciones del kit de purificación ZYMO Research, se añadieron 200 µl de DBB (*DNA Binding Tampón*) al producto del ensamblaje, se traspasó a una columna de gel de sílice colocada en un colector y se centrifugó 30 s a 13 000 rpm. Tras ello, se retiró el filtrado y se realizaron dos lavados, los cuales consistieron en la adición de 200 µl de tampón de lavado (WB), posterior centrifugación durante 30 s a 13 000 rpm y el descarte del filtrado. Tras ello, se produjo un último lavado con 200 µl de 80% etanol, en el que se centrifugó 30 s a 13 000 rpm y se retiró el filtrado. Por último, la columna se colocó en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml y se le añadieron 10 µl de 0.1X EB (para disminuir la concentración final de sales) precalentado a 60 °C. Este se incubó durante 1 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó 1 min a 13 000 rpm, recogiendo y guardando el eluido final.

## **6. Transformación de *Escherichia coli***

Se transformaron los diferentes plásmidos generados en las distintas reacciones Gibson en células electrocompetentes de *E. coli* DH5α. Para ello, se mezclaron 4 µl del producto de la reacción junto con 40 µl de *E. coli* DH5α en tubos Eppendorf de 1.5 ml y la mezcla se pasó a una cubeta de electroporación previamente enfriada en hielo. Una vez hecho esto, se electroporaron a 1700 V durante 5 ms en el electroporador. Rápidamente, se añadió 1 ml de medio líquido SOC (20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 0.5 g/l NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM glucosa, pH 7.0) a la cubeta, se resuspendió la mezcla y se pasaron las células electroporadas a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Tras ello, se incubó a 37 °C durante 1 h en agitación y finalmente se plaquearon 10 µl y el resto, respectivamente, en placas de Petri con LB suplementado con el antibiótico correspondiente, donde se seleccionaron las colonias positivas. Dichas placas se dejaron incubando 24 h a 37 °C hasta la selección de las colonias.

## **7. Minipreparación de plásmidos**

Una vez crecida las placas de Petri, se picó con palillos estériles colonias aisladas de un tamaño intermedio y se colocaron en tubos de ensayo con 2.5 ml de medio LB líquido junto con su antibiótico correspondiente. Estos tubos se incubaron a 37 °C durante 24 h y al día siguiente se tomaron 2 ml del cultivo saturado y se traspasaron a un nuevo tubo Eppendorf de 2 ml, los cuales se centrifugaron durante 2 min a 13 000 rpm, descartando el sobrenadante. Posteriormente se procedió a la purificación de los plásmidos bacterianos mediante el kit *Genejet Plasmid Miniprep* (Thermo Scientific). En primer lugar,

se añadieron 250 µl de solución A1 (tampón de resuspensión con RNasa) y se homogeneizó junto al sedimento anterior mediante un agitador tipo vórtex. Tras ello, se añadieron 250 µl de solución A2 (tampón de lisis), se mezcló por inversión unas 6-8 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se añadieron 350 µl de solución A3 (tampón de neutralización), se mezcló por inversión unas 6-8 veces y se centrifugó durante 10 min a 13 000 rpm, traspasando el sobrenadante a una columna de gel de sílice. Esta columna con el sobrenadante se centrifugó durante 1 min a 13 000 rpm y se retiró el filtrado. Posteriormente se realizaron dos lavados con 500 µl de A4 (tampón de lavado), centrifugando 1 min a 13 000 rpm y descartando el filtrado. Finalmente, se añadieron 40 µl de tampón de elución en la columna, se incubó durante 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 min a 13 000 rpm, obteniendo en el eluido el plásmido, el cual se cuantificó posteriormente en el Nanodrop Nabi (MicroDigital).

## **8. Secuenciación de plásmidos y análisis**

Los plásmidos obtenidos se analizaron por secuenciación. Para ello, 10 µl de plásmido a 50 ng/µl se mandaron a secuenciar junto al cebador correspondiente para la secuenciación, el cual se encontraba a una concentración de 5 µM. Dicha secuenciación se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del IBMCP (<https://www.csic.es/es/investigacion/catalogo-de-servicios-cientifico-tecnico/unidades-de-servicio/servicio-de-4>). Las secuencias obtenidas fueron analizadas usando las herramientas ClustalW y Benchling (<https://www.benchling.com/>).

## **9. Transformación de *A. tumefaciens***

Tras la obtención de los plásmidos binarios finales, se procedió a la transformación de células electrocompetentes de *A. tumefaciens*. Dicho proceso de transformación es muy similar al que se empleó con *E. coli*, aunque con sutiles diferencias. Para la transformación, se mezcló en una cubeta de electroporación previamente enfriada 1 µl de plásmido junto con 40 µl de *A. tumefaciens*. Dicha mezcla se electroporó y se resuspendió en 1 ml de medio SOC en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml, incubándose posteriormente durante 2 h a 28 °C en agitación y finalmente plaqueándose la mezcla en placas de LB con tetraciclina 7.5 µg/ml, rifampicina 50 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml. Dichas placas se dejaron creciendo a 28 °C durante 4 días (en el caso de PVX) o 6 días (en el caso de TEV).

## **10. Agroinfiltración de plantas**

Una vez crecidas las colonias, se picaron colonias aisladas con palillos estériles en tubos de ensayo con 10 ml de LB líquido con kanamicina (50 µg/ml) y se dejaron crecer a 28 °C en agitación durante 1-2 días (según si es PVX o TEV, respectivamente) o hasta mostrar turbidez. Una vez en este estado, se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm (OD<sub>600</sub>) buscando obtener densidades ópticas alrededor

de 0.5. Una vez medidas las DO, se calculó el volumen de cultivo necesario para llevar el cultivo a una OD<sub>600</sub> igual a 0.5 en un volumen final de 1.8 ml de medio de agroinfiltración (10 mM MES-NaOH pH 5.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>). Dicho volumen se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de bacterias en 1.8 ml de medio. Tras ello, se añadió acetosiringona hasta una concentración final de 150 µM y se incubó durante 2 h a 28 °C en agitación. En caso de co-infiltración con dos *A. tumefaciens* transformados diferentes, tras la incubación se mezclaron ambos cultivos en volúmenes iguales (1:1).

Al finalizar la incubación, se procedió a la infiltración hojas de *N. benthamiana* por el envés. Para ello, se apoyó la jeringa sin aguja cargada previamente con el cultivo y se inyectó comprobando la entrada del cultivo en el apoplasto, lo cual se observó al cambiar el color de la hoja. Las hojas seleccionadas fueron hojas jóvenes, pero sin ser apicales. Dichas plantas se dejaron crecer en el fitotrón (SANYO) a la espera de ser recogidas a los 7-20 días posteriores a la infección.

### **11. Extracción de RNA de plantas infectadas**

Se recogió aproximadamente 0.1 g de tejido infectado y se introdujo en tubos Eppendorf de 2 ml junto con una bolita de acero y posteriormente se congeló en N<sub>2</sub> líquido o en el congelador de -80 °C durante 24 h. Tras ello, se añadió 1 ml de TEX (4 M tiocianato de guanidinio, 0.1 M acetato sódico pH 5.5, 10m M EDTA, 0.1M β-mercaptoetanol) y se trituró en el STAR-BEATER (VWR) durante 1 min a una frecuencia de 30 s<sup>-1</sup>. Posteriormente, se centrifugó durante 5 min a 13 000 rpm, guardando 600 µl de sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml. En dicho tubo, se añadieron 0.39 ml de etanol 96%, se mezcló por agitación tipo vórtex y se volvió a centrifugar durante 2 min a 13 000 rpm. Del sobrenadante obtenido, se traspasaron 700 µl a una columna de gel de sílice (ZYMO Research) colocada sobre un tubo colector de 2 ml y se centrifugó durante 1 min a 13 000 rpm, descartando posteriormente el filtrado. A continuación, se realizaron dos lavados con 0.5 ml de TLA (70% etanol, 10 mM acetato sódico pH 5.5), centrifugando durante 30 s y 1 min respectivamente, descartando el filtrado en cada paso. Finalmente, se eluyó el RNA unido en la columna. Para ello, se añadieron 10 µl de TEL (20 mM Tris-HCl en H<sub>2</sub>O, pH 8.5) a la columna y se incubó a temperatura ambiente durante 1 min y posteriormente se centrifugó durante 2 min a 13 000 rpm, conservando el RNA eluido. Dicho RNA se almacenó a -80°C en caso de no usarse inmediatamente. La concentración del RNA extraído se analizó en el Nanodrop Nabi (MicroDigital).

### **12. Retrotranscripción (RT) del RNA y amplificación de cDNA por PCR**

Se realizó la retrotranscripción (RT) del RNA mezclando por reacción en un tubo Eppendorf de 0.2 ml 1 µl de cebador 5 µM, 2.5 µl de RNA y 3 µl de H<sub>2</sub>O. Dichas preparaciones se incubaron en un termociclador durante 90 s a 98 °C y posteriormente durante 1 min a 42 °C. En ese momento, rápidamente se puso en pausa el programa del termociclador y se añadieron a las preparaciones 3.5 µl de

la mezcla compuesta de 2 µl de tampón RT 5x (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 1 µl de 10 mM dNTPs, 0.25 µl de inhibidor de RNAsas (40 U/µl) y 0.25 µl de la retrotranscriptasa M-MuLV-RT (200 U/µl, Thermo Scientific). A continuación, se reanudó el programa incubando las reacciones a 42 °C durante 45 min, a 50 °C durante 10 min, a 69 °C durante 5 min y finalmente incubando 15 min a 75 °C para inactivar la retrotranscriptasa; obteniendo así el cDNA de interés.

Tras ello, se realizó la amplificación del cDNA por PCR, en este caso usando la polimerasa *Tth* (*Thermus thermophilus* HB27, Epica S.L.). Para una reacción de PCR, se mezclaron 0.2 µl de la polimerasa *Tth*, 8 µl del tampón *Tth* (10x), 0.4 µl de 10 mM dNTPs, 0.8 µl tanto de cebador *forward* como *reverse* (25 µM), 1 µl de cDNA y completando hasta 20 µl con H<sub>2</sub>O. Tras ello, se introdujo en un termociclador siguiendo el programa descrito en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Programa con las condiciones a seguir para llevar a cabo las reacciones de PCR (*Tth*) en el termociclador.

Proceso		Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial		2 min	94 °C
Desnaturalización	x30 ciclos	40 s	94 °C
Hibridación		30 s	55 °C
Extensión		1 kb/min	72 °C
Extensión final		10 min	72 °C

### 13. Extracción de proteínas

Se tomó aproximadamente 0.1 g de tejido infectado, se colocó en tubos Eppendorf de 2 ml con una bola de acero y se congeló a -80 °C. Una vez congelado, se añadieron 300 µl de tampón de extracción TEW (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 100 mM DTT, 10% glicerol, 0.01% azul bromofenol) y se trituró durante 1 min en el STAR-BEATER a una frecuencia de 30 s<sup>-1</sup>. Dicho homogeneizado se centrifugó durante 3 min a 13 000 rpm, tomando 100 µl del sobrenadante e incubándolo posteriormente a 95 °C durante 5 min.

### 14. Electroforesis en gel de acrilamida para proteínas

Se emplearon geles de acrilamida 12% previamente preparados. Dichos geles constan de dos componentes: el gel *resolving* (por cada gel: 1.875 ml de Tris 1 M pH 8.8, 1.65 ml 30% acrilamida:bisacrilamida (37.5:1), 50 µl SDS 10%, 5 µl TEMED, 50 µl persulfato amónico 10%) y gel *stacking* (por cada gel: 1.42 ml H<sub>2</sub>O, 250 µl de Tris 1 M pH 6.8, 335 µl 30% acrilamida:bisacrilamida (37.5:1), 20 µl SDS 10%, 2 µl TEMED, 20 µl persulfato amónico 10%). Para formar el gel, primero se colocaron los cristales donde se preparó el gel en las cubetas correspondientes y se fijó para que no se escapara el líquido. Tras ello, primero se introdujeron 5 ml del gel *resolving* y posteriormente se añadieron 100 µl de isopropanol. Una vez solidificado, se retiró el isopropanol, se añadieron 2 ml de gel *stacking* y se colocó el peine con el número de pocillos deseado.



Dicho gel se introdujo en una cubeta de electroforesis de proteínas, lleno con TGS x1 (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.5% SDS), al cual se le había quitado previamente el peine. Tras ello, 20 µl de las muestras previamente calentadas se colocaron en los distintos pocillos del gel, dejando un pocillo para colocar el marcador de peso molecular. Finalmente, se corrió el gel a una corriente constante, durante 1 h a 35 mA.

### **15. Electrotransferencia**

Se montó un sándwich formado por 3 papeles de Blotting (Albet LabScience), la membrana, el gel de proteínas y otros 3 papeles; en ese orden. La membrana de PVDF (Amersham) se hidrató previamente durante 10 min con metanol, se lavó 3 veces con agua y se incubó al igual que resto de componentes con tampón de electrotransferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina). Dicho sándwich se colocó en el Semi-Dry Blotter Unit (SCIE-PLAS) y se le eliminaron las posibles burbujas del sándwich aplastándolo y pasando un tubo Falcon por encima. Finalmente, se inició el programa de electrotransferencia, a una corriente constante durante 1 h y a 70 mA.

### **16. Detección con anticuerpos por Western-blot**

Primero, se bloqueó la membrana y para ello se añadió la membrana en una cubeta de cristal con 20 ml de leche desnatada 5% en tampón de lavado WB 1X (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 154 mM NaCl, 0.1% Nonidet P40) y se incubó a temperatura ambiente en agitación durante 1 h. Una vez finalizado este proceso, se inició la incubación con el anticuerpo correspondiente. En esta fase, se eliminó la solución de la cubeta y se añadieron de nuevo 10 ml de la solución anterior junto con el anticuerpo comercial deseado (en una dilución 1:10.000), dejando incubar la membrana a 4 °C en agitación. Al día siguiente, se comenzaron los lavados. Primero se quitó la solución con el anticuerpo y se realizaron dos lavados rápidos con tampón WB 1X y posteriormente se realizaron tres lavados con WB 1X durante 10 min en agitación. Una vez lavado, se procedió a revelar la membrana.

En el caso de ser un anticuerpo comercial que tenga asociado la peroxidasa de rábano (HRP) al propio anticuerpo, se empleó el kit comercial SuperSignal™ Western-Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific). Se preparó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml 800 µl de reactivo por membrana, el cual consta de 400 µl del reactivo *Stable Peroxidase* y 400 µl del reactivo *Luminol/Enhancer*. Estos 800 µl de reactivo se colocaron sobre un plástico, en el cual se depositó la membrana asegurando el contacto completo entre el reactivo y la membrana y se incubó durante 2 min en oscuridad. Tras ello, se retiró el exceso de reactivo de la membrana, se limpió el plástico y se tapó con papel de plata para mantener la oscuridad. Finalmente, se reveló la membrana en el ImageQuantum 800 (Amersham), donde se usó el programa de quimioluminiscencia tomando imágenes seriadas durante aproximadamente 20 min.

### **17. Tinción de geles de proteínas con azul de Coomassie**

El gel resultante de la electroforesis de proteínas se incubó durante 1-2 h en solución de tinción (0,1% azul brillante Coomassie G250, 45% metanol, 10% ácido acético) en agitación a temperatura ambiente. Tras ello, se realizaron 3 lavados con solución de lavado (20% metanol, 5% ácido acético) hasta que sean observables el patrón de proteínas a simple vista. El gel se conservó en una cubeta con H<sub>2</sub>O Mili-Q.

### **18. Purificación de partículas virales**

Se comenzó pesando las muestras de hoja infectada previamente recogidas y dividiéndolas en tubos Falcon con 5 g de muestra. A dichos tubos se le añadieron 2 volúmenes de tampón fosfato 0.1 M, pH 7.2, EtOH 10% y se trituró usando el sonicador Polytron PT-2500 (Kinematica) hasta que la muestra estuvo triturada y homogeneizada. Tras ello, se filtraron usando una gasa Miracloth (Calbiochem) y posteriormente se añadieron Tritón y  $\beta$ -mercaptoetanol hasta dejarlos a 1% y 0.1% respectivamente en el volumen final; y posteriormente se centrifugó durante 10 min a 10 000 rpm y a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante obtenido se incubó durante 1h a 4 °C en agitación constante y posteriormente se volvió a centrifugar durante 20 min en frío (4 °C) a 14 000 rpm. A continuación, se ultracentrifugó durante 3 h a 26 000 rpm en frío (4 °C), usando la L70-Ultracentrifuge (Beckman). El precipitado obtenido se resuspendió en 1 ml de tampón fosfato 0.1 M, Triton 1% (sin etanol ni  $\beta$ -mercaptoetanol) mediante suave agitación constante a 4 °C hasta el día siguiente. Tras este proceso, se realizó la purificación mediante gradiente de sacarosa. Para ello, se centrifugaron de nuevo las muestras durante 2 min a 11 000 rpm en frío (4 °C) y el sobrenadante se traspasó a tubos SW40 (Beckman), completando hasta 2 ml con tampón fosfato. Posteriormente, con la ayuda de una pipeta Pasteur se generó el gradiente añadiendo consecutivamente 2 ml de sacarosa 10%, 20%, 30%, 40% y 50% por debajo de la muestra anterior. Estos tubos se ultracentrifugaron a 30 000 rpm durante 2 h en frío (4 °C). A continuación, se prepararon 8 tubos Eppendorf de 1.5 ml en los cuales se tomaron alícuotas del gradiente. Para ello, con una aguja se realizó un agujero en el lateral de la base del tubo, lo cual permitió recoger el gradiente gota a gota en distintas fracciones. Finalmente se evaluó la presencia de partículas virales en cada fracción por medio de ensayos de Western-blot. Dichas fracciones se juntaron, se dializaron en tampón fosfato 0.1 M y se concentró la muestra utilizando una columna Centricón (Millipore) con una membrana de corte de 100 kDa.

### **19. Microscopía electrónica de transferencia (TEM)**

Las preparaciones de los viriones fueron teñidos con ácido fosfotúngstico al 1%, pH 7.0, usando la técnica de la gota (*drop technique*). La rejilla (solo recubierta de una película de carbono, mallas de 200, EMS) fue superpuesta en una gota de 10  $\mu$ l de muestra e incubado posteriormente durante 10 min. Las

rejillas se lavaron con agua, se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 2% y se dejó secar a temperatura ambiente. Las preparaciones de los viriones fueron examinadas con el microscopio electrónico JEM-1400Flash 120kV (JEOL).

## **20. Microscopía óptica de fluorescencia**

Las muestras infectadas con virus que generaban fluorescencia se colocaron en la lupa LEICA HZ 16F. Se emplearon los filtros de fluorescencia ET-GFP y DsRED, los cuales filtraban una frecuencia de excitación de 425/60 y 544/30 y dejaban pasar de vuelta una frecuencia de emisión de 505/40 y 620/60, necesarias para observar la fluorescencia de GFP y mCherry, respectivamente. En el caso de querer observar el campo claro se utilizó el filtro V, el cual estaba vacío y permitía el paso de la luz blanca. Las muestras fueron analizadas usando el programa Leica Application Suite V4.12 (LEICA), tomando los siguientes parámetros. Para la observación del campo claro, se utilizó una exposición de 5 s y una ganancia 1X; para la observación de GFP se empleó una exposición de 5 s y una ganancia 1X; y para la observación de DsRED se utilizó una exposición de 5 s y una ganancia 10X. Finalmente, las imágenes obtenidas y su posterior análisis de colocalización (si es requerido) se realizó mediante el uso del software bioinformático ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

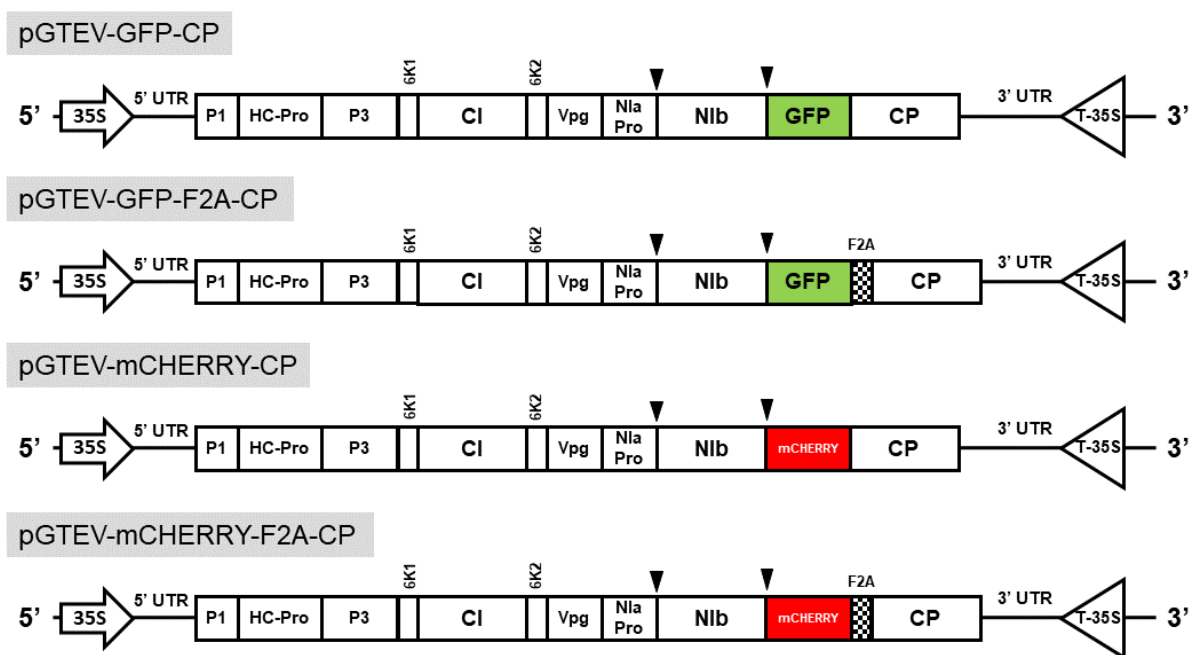
## **21. Condiciones de crecimiento de las plantas**

En estos experimentos se emplearon plantas de *Nicotiana benthamiana*. Dichas plantas se cultivaron y crecieron en el invernadero en condiciones controladas de temperatura (25 °C) y con un ciclo de medio día de luz (12 h luz / 12 h oscuridad). Dichas plantas crecieron en semilleros hasta tener un tamaño adecuado para ser trasplantadas a macetas, en la cual se colocaron unas 4 plantas por maceta. Dichas plantas crecieron hasta tener unas 4-5 semanas de edad, en las cuales eran aptas para realizar experimentos de agroinfiltración. Una vez infiltradas, dichas plantas siguieron su desarrollo en el fitotrón (SANYO), en el cual continuaron su crecimiento a las mismas condiciones anteriormente descritas hasta la recogida de material.

# RESULTADOS

## 1. Producción de nanopartículas de TEV fluorescentes

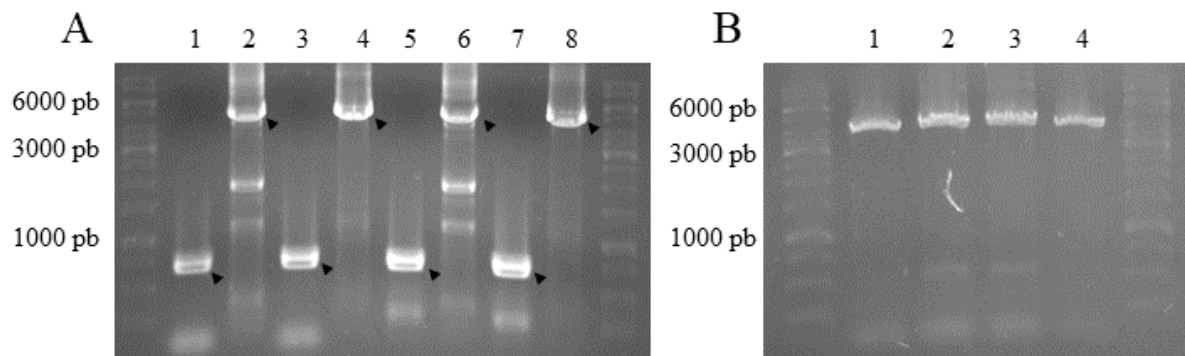
El primer objetivo de este proyecto fue el diseño de las diferentes construcciones que se emplearían para la creación de los viriones de TEV fluorescentes. Tomando como base el plásmido pGTEV (Bedoya and Daròs, 2010), un vector binario capaz de replicarse tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens* y que contiene un clon infeccioso de TEV, se construyeron cuatro vectores a los cuales se les fusionó en el extremo 5' del cistrón *cp* las secuencias de *gfp* o *mcherry*, seguidas o no por la secuencia F2A del picornavirus FDMV. Las construcciones generadas se denominaron pGTEV-GFP-CP, pGTEV-GFP-F2A-CP, pGTEV-mCHERRY-CP, pGTEV-mCHERRY-F2A-CP (**Figura 7**).



**Figura 7.** Representación esquemática de los vectores de expresión pGTEV-GFP-CP, pGTEV-GFP-F2A-CP, pGTEV-mCHERRY-CP y pGTEV-mCHERRY-F2A-CP, los cuales contienen el genoma completo de TEV bajo el control del promotor y terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Los triángulos negros indican sitios de corte de Nib.

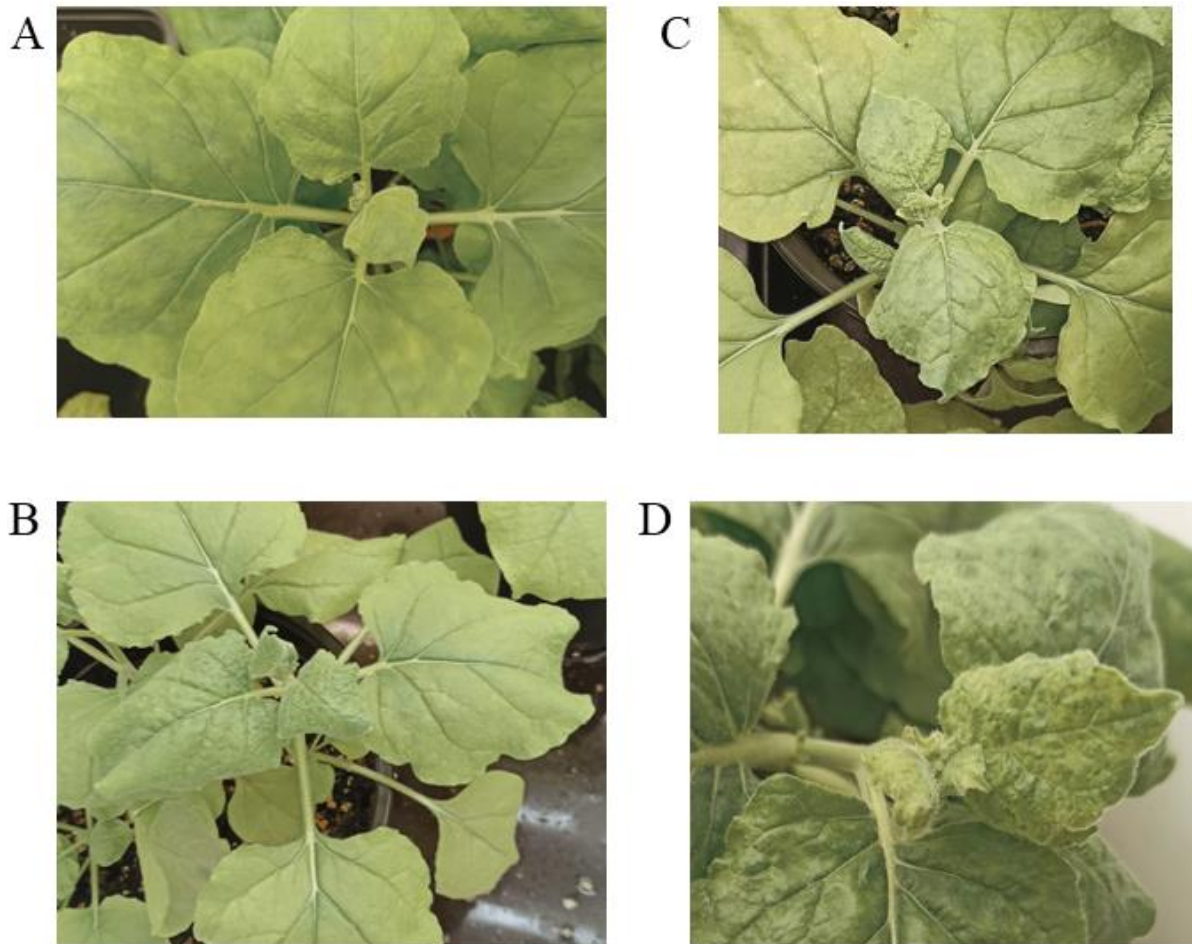
Se amplificaron las secuencias nucleotídicas de interés mediante la PCR, usando los cebadores descritos en el Material Suplementario 1. Posteriormente, se empleó el método de ensamblaje Gibson para fusionar las secuencias de interés al cistrón *cp* en un plásmido intermedio (**Figura 8A**), el cual sólo tenía un origen de replicación de *E. coli* y contenía la secuencia NIa-NIb-F2A-CP-3'UTR-Terminador35S, con el fin de facilitar el clonado y su posterior introducción en el plásmido final. Una vez obtenido el plásmido intermedio, este se secuenció y se usó como molde para amplificar su

secuencia e introducirla en el plásmido final. Dicho vector final fue previamente digerido con las enzimas de restricción *ApaI* y *Eco81I* para su posterior ensamblaje (**Figura 8B**).



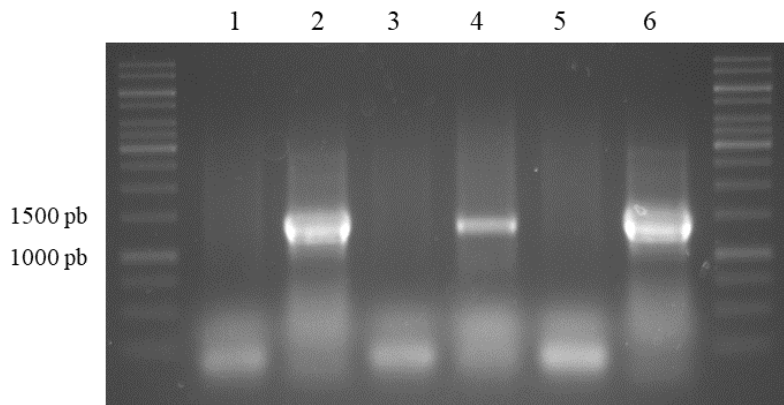
**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos generados para el ensamblaje de las construcciones pGTEV-GFP-CP, pGTEV-GFP-F2A-CP, pGTEV-mCHERRY-CP, pGTEV-mCHERRY-F2A-CP mediante el método de ensamblaje Gibson. **(A)** Productos de PCR para el ensamblaje en el plásmido intermedio. 1, PCR de GFP para introducir en plásmido intermedio (734 pb); 2, PCR del plásmido intermedio para introducir GFP (4874 pb); 3, PCR de GFP-F2A para introducir en plásmido intermedio (734 pb); 4, PCR del plásmido intermedio para introducir GFP-F2A (4948 pb); 5, PCR de mCherry para introducir en plásmido intermedio (725 pb); 6, PCR del plásmido intermedio para introducir mCherry (4876 pb); 7, PCR de mCherry-F2A para introducir en plásmido intermedio (725 pb); 8, PCR del plásmido intermedio para introducir mCherry-F2A (4950 pb). **(B)** Productos de PCR para el ensamblaje en el plásmido final GTEV previamente digerido con *ApaI* y *Eco81I*. 1-4, PCR de los plásmidos intermedios de GTEV-GFP-CP, GTEV-GFP-F2A-CP, GTEV-mCHERRY-CP, GTEV-mCHERRY-F2A-CP (respectivamente) para la introducción en el plásmido final (aproximadamente 4000 pb).

Una vez construidos los plásmidos finales, se corroboró la ausencia de mutaciones no deseadas por secuenciación y, posteriormente, se procedió a la expresión de los virus recombinantes en plantas de *N. benthamiana* para el posterior análisis de la infección con el objetivo de determinar la presencia de partículas virales que presentaran fluorescencia. Para ello, dichas construcciones previamente introducidas en *A. tumefaciens* se agroinfiltraron por inyección en plantas de entre 3-4 semanas de edad. Además, también inoculamos un clon de TEV que expresaba GFP no fusionada a ninguna proteína viral (pGTEV-GFP<sub>free</sub>) que ya había sido usado anteriormente en el laboratorio, a modo de control positivo. Tras 15 días post-inoculación (dpi), pudimos observar síntomas de infección viral en tejido sistémico de las plantas infectadas con TEV-GFP-F2A-CP y con TEV-mCHERRY-F2A-CP, mostrando claramente síntomas asociados a la infección de TEV, como son el empaldecimiento de las venas, la aparición de moteado en las hojas y la curvatura y deformidad de las hojas (**Figura 9**). Por otro lado, las plantas agroinoculadas con los vectores pGTEV-GFP-CP y pGTEV-mCHERRY-CP no presentaron síntomas de infección local ni sistémica, manteniendo la misma apariencia que las plantas control sin infectar (**Figura 9A**).



**Figura 9.** Plantas de *N. benthamiana* a los 20 dpi tras ser infectadas con diferentes clones de TEV. **(A)** Planta control sin infectar, **(B)** infectada con TEV-GFP<sub>free</sub>, **(C)** con TEV-GFP-F2A-CP y **(D)** con TEV-mCHERRY-F2A-CP mostrando infección sistémica. Se observa un claro arrugamiento y curvatura en las hojas, junto con un empaldecimiento de las venas.

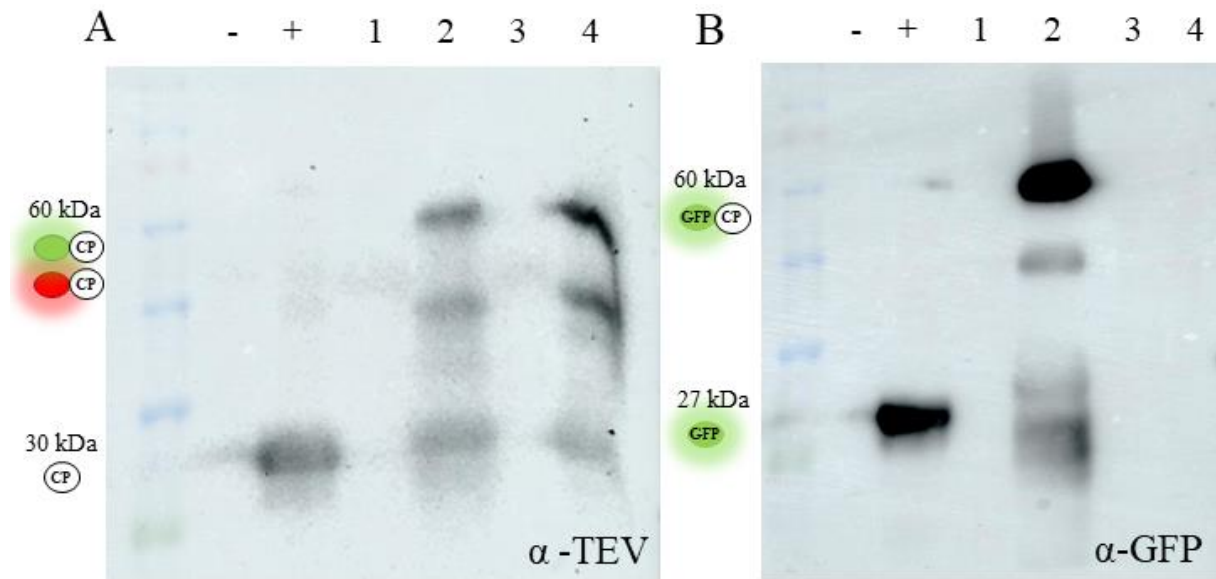
Posteriormente, se procedió al análisis de la infección viral de las diferentes construcciones generadas. Primero realizamos un análisis de la expresión viral por RT-PCR. Con este análisis, se pudo determinar principalmente la presencia de genoma viral de TEV en la planta y, concretamente, de las secuencias fusionadas a la *cp* en el RNA viral. Para ello, se tomaron muestras de hojas apicales con síntomas (en el caso de presentarlos) de plantas inoculadas con las diferentes construcciones, se purificó el RNA total, se realizó su retrotranscripción con el cebador D2231 y se amplificó por PCR la secuencia contenida entre la *nib* y la *cp* del cDNA generado usando los cebadores D3599 y D3600. Como se observa en la **Figura 10**, el diagnóstico molecular confirmó la presencia de RNA viral en las plantas inoculadas con pGTEV-GFP<sub>free</sub>, pGTEV-GFP-F2A-CP y pGTEV-mCHERRY-F2A-CP, las cuales además presentaban las secuencias fusionadas al observarse bandas de un tamaño de 1302 pb y 1293 pb, en vez de 501 pb, que corresponderían al tamaño del fragmento generado sin ninguna fusión en su secuencia. Además, confirma que la ausencia de síntomas en las plantas inoculadas con pGTEV-GFP-CP y pGTEV-mCHERRY-CP es debido a la ausencia de replicación viral.



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del cDNA tras la RT-PCR. 1, Control negativo de una planta sin infectar; 2, control positivo de una planta inoculada con el plásmido pGTEV-GFP<sub>free</sub>; 3, muestra de hoja inoculada con pGTEV-GFP-CP; 4, muestra de hoja inoculada con pGTEV-GFP-F2A-CP (1302 pb); 5, muestra de hoja inoculada con pGTEV-mCHERRY-CP; 6, muestra de hoja inoculada con pGTEV-mCHERRY-F2A-CP (1293 pb).

A continuación, se procedió a analizar la expresión viral a nivel de proteínas, con el fin de asegurar la correcta expresión de las proteínas fusionadas a las partículas de la cápside. Para ello se realizaron análisis de detección con diferentes anticuerpos por Western-blot de las diferentes muestras tomadas junto con una planta sin infectar (control negativo) y una infectada con TEV-GFP<sub>free</sub> (control positivo). Al analizar el Western-blot en el que se usó un anticuerpo contra la CP de TEV (**Figura 11A**), se pudo observar un patrón de bandas similar en las plantas inoculadas con pGTEV-GFP-F2A-CP y pGTEV-mCHERRY-F2A-CP, observándose una banda superior correspondiente a 60 kDa que es el tamaño esperado para la proteína CP fusionada con GFP/mCherry; ya que ambas proteínas fluorescentes presentan un tamaño similar y por eso no se pueden detectar diferencias de tamaño entre ambas. Esto confirma que ambas construcciones son estables y capaces de producir partículas de la cápside fusionadas con proteínas fluorescentes, al mismo tiempo que generan CP libre debido al efecto de la secuencia de escape ribosomal F2A. La CP libre se detectó en la última banda del patrón, la cual presenta un tamaño de 30 kDa, igual que la observada en el control positivo, cuya CP no se encuentra modificada. El resto de bandas observadas pueden ser productos de degradación que se generan durante la infección viral o la extracción. Por otro lado, se realizó un Western-blot en el que se usó un anticuerpo contra GFP (**Figura 11B**) con el objetivo de analizar la proteína fusionada a la CP en las construcciones pGTEV-GFP-CP y pGTEV-GFP-F2A-CP. Se pudo observar en el control positivo una banda correspondiente a 27 kDa, tamaño que coincide con la proteína GFP libre. En la planta inoculada con pGTEV-GFP-F2A-CP se pudo observar una banda correspondiente a 60 kDa, tamaño de la proteína GFP fusionada a la CP, así como diferentes bandas de menor tamaño que pueden deberse a productos de degradación generados durante la infección o extracción. En el caso de plantas inoculadas con el resto de vectores, no se detectó presencia de GFP, lo cual era de esperar en las construcciones que expresan mCherry. En conclusión,

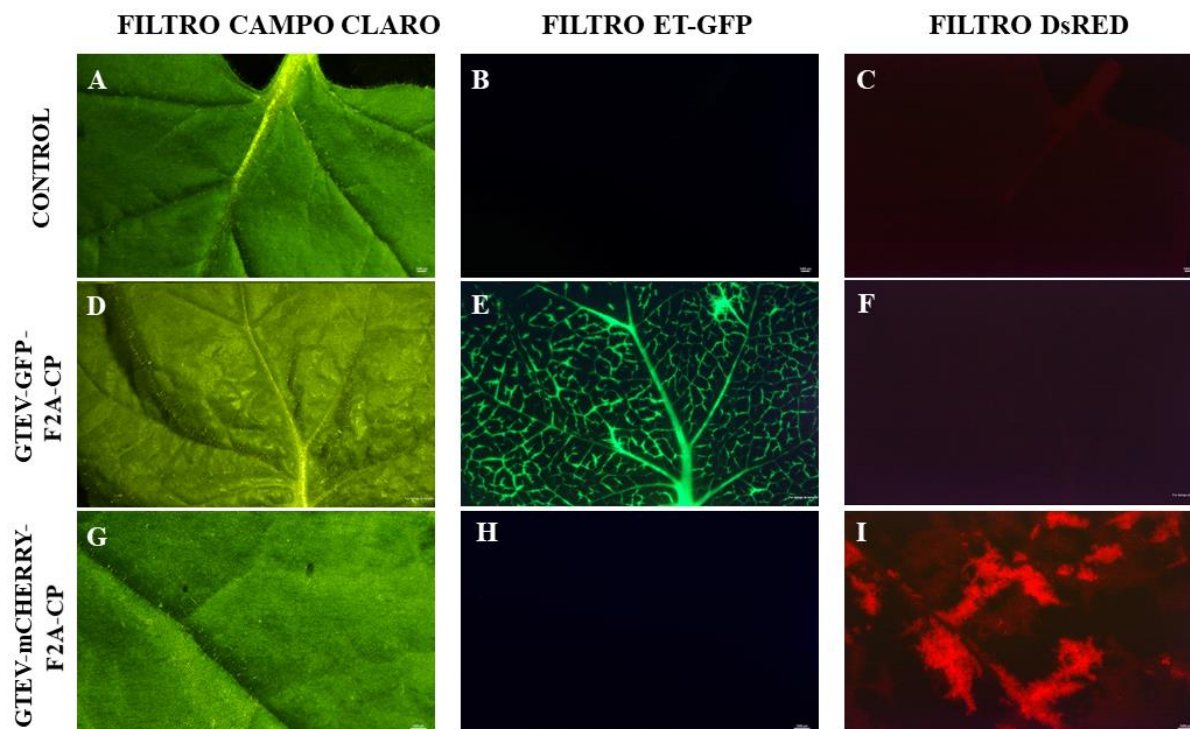
estos resultados indican que la inserción de la secuencia F2A es necesaria para iniciar una infección y generar una progenie viral parcialmente decorada con proteínas fusionadas a la CP viral.



**Figura 11.** Detección con anticuerpos contra la CP de TEV (A) y GFP (B) por Western-blot de las proteínas presentes en las muestras inoculadas con las distintas construcciones utilizadas hasta el momento. (-), *N. benthamiana* sin infectar; (+), hoja sintomática procedente de una planta inoculada con un vector pGTEV modificado para expresar GFP libre en el citoplasma (pGTEV-GFP<sub>free</sub>); 1, hoja procedente de una planta inoculada con pGTEV-GFP-CP; 2, hoja sintomática procedente de una planta inoculada con pGTEV-GFP-F2A-CP; 3, hoja procedente de una planta inoculada con pGTEV-mCHERRY-CP; 4, hoja sintomática procedente de una planta inoculada con pGTEV-mCHERRY-F2A-CP.

Finalmente, se procedió a analizar la correcta actividad de las proteínas fluorescentes fusionadas a la CP viral. Para ello, se tomaron fotos en la lupa de hojas recolectadas de plantas infectadas con TEV-GFP-F2A-CP y con TEV-mCHERRY-F2A-CP expuestas a longitudes de onda específicas capaces de excitar GFP o mCherry y generar fluorescencia. Como se puede observar en la **Figura 12**, la hoja control proveniente de una planta no infectada no presentó ningún tipo de fluorescencia, mientras que la hoja inoculada con pGTEV-GFP-F2A-CP presentó claramente fluorescencia verde y la inoculada con pGTEV-mCHERRY-F2A-CP presentó fluorescencia roja. Este análisis confirma que para ambos clones infecciosos la progenie viral mantiene la expresión y la correcta actividad de las proteínas fluorescentes a nivel sistémico.



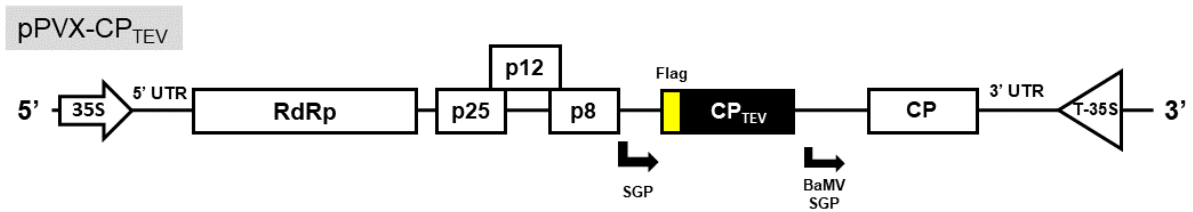


**Figura 12.** Hojas de *N. benthamiana* analizadas por microscopía de fluorescencia. (A-C) Hoja control sin infectar vista con el filtro campo claro (A), filtro ET-GFP (B) y DsRED (C). (D-F) Hoja infectada con GTEV-GFP-F2A-CP vista con el filtro campo claro (D), filtro ET-GFP (E) y DsRED (F). (G-I) Hoja infectada con GTEV-mCHERRY-F2A-CP vista con el filtro campo claro (G), filtro ET-GFP (H) y DsRED (I).

## 2. PVX como vector de expresión de proteínas de la cápside de TEV

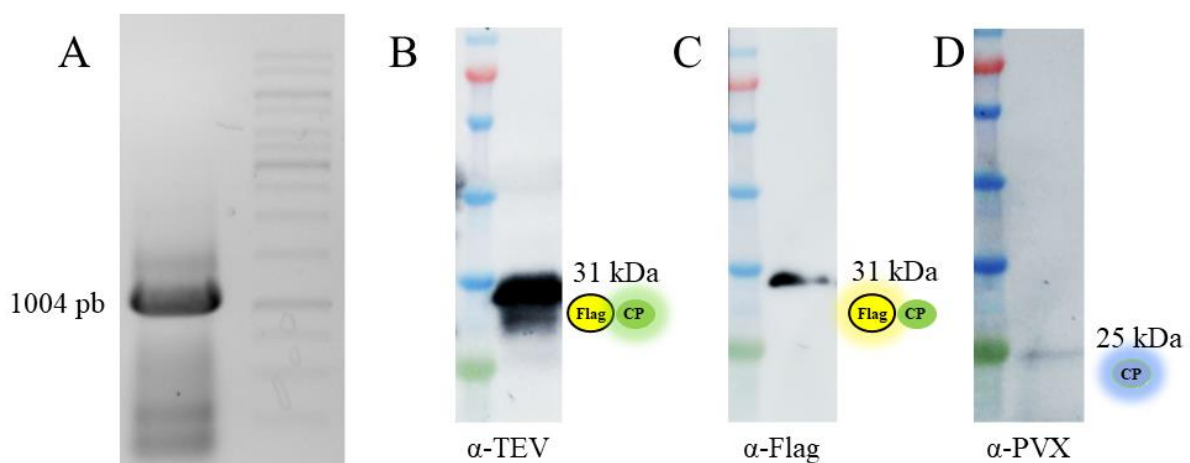
Tras demostrar la correcta actividad infecciosa de partículas de TEV presentando una proteína fluorescente en su superficie, el siguiente objetivo de este proyecto fue la obtención de VNPs híbridas derivadas de TEV capaces de mostrar ambas fluorescencias simultáneamente. Para ello, se siguió una estrategia de co-inoculación con otro virus compatible, como es el caso de PVX; el cual ya se ha demostrado que es capaz de coinfectar plantas de *N. benthamiana* en forma sinérgica con TEV (Bedoya et al., 2010b).

El primer paso que se llevó a cabo fue la construcción de un clon infeccioso de PVX que exprese CP de TEV (CP<sub>TEV</sub>) libre en el citoplasma. Para ello, se utilizó un vector ya descrito por nuestro grupo en el cual se pueden expresar marcos de lectura exógenos bajo el promotor subgenómico de PVX, mientras que su propia CP se expresa bajo el promotor del virus del mosaico del bambú (BaMV) (Uranga et al., 2021b). Dicha construcción fue denominada como pPVX-CP<sub>TEV</sub> (**Figura 13**). Para permitir diferenciar esta CP específicamente, se le insertó un epítopo Flag en el extremo 5'.



**Figura 13.** Representación esquemática del vector viral de expresión pPVX-CP<sub>TEV</sub>, el cual contiene el genoma completo de PVX bajo el control del promotor y terminador 35S del CaMV. Mediante el uso del promotor subgenómico de PVX (SGP) se produce la proteína CP<sub>TEV</sub>, mientras que su propia CP<sub>PVX</sub> se produce bajo la acción del promotor subgenómico del virus del mosaico del bambú (BaMV SGP). RdRp, RNA polimerasa; p25, p12 y p8 forman un bloque de tres genes que codifica proteínas involucradas en el movimiento viral; CP, proteína de cubierta.

Al igual que con las construcciones anteriores, este vector viral fue inoculado en plantas de *N. benthamiana* por agroinfiltración, observándose síntomas en hojas sistémicas a los 7 dpi. Se tomaron muestras de dichas plantas infectadas y se analizaron por RT-PCR y por Western-blot. Al analizar por electroforesis en gel de agarosa los productos de la RT-PCR, se pudo observar un producto de 1004 pb (**Figura 14A**), la cual correspondía al fragmento comprendido entre p8 y la CP de PVX, lo que confirmó la estabilidad de RNA viral modificado y su expresión en la planta. Al estudiar la expresión a nivel de proteínas de PVX-CP<sub>TEV</sub>, pudimos observar que tanto usando anticuerpos contra la CP de TEV como contra la etiqueta Flag, en el análisis Western-blot se podía observar claramente una banda correspondiente a 31 kDa, que es el tamaño de la CP<sub>TEV</sub> fusionada a Flag (**Figura 14B y C**). Además, al emplear un anticuerpo específico contra la CP de PVX, pudimos observar una banda correspondiente a 25 kDa, lo cual implica que la propia CP del virus PVX se está expresando (**Figura 14D**). Estos resultados indican que el vector pPVX-CP<sub>TEV</sub> es capaz de generar un virus funcional capaz de producir de manera eficaz y sistémica la CP<sub>TEV</sub> en la planta.

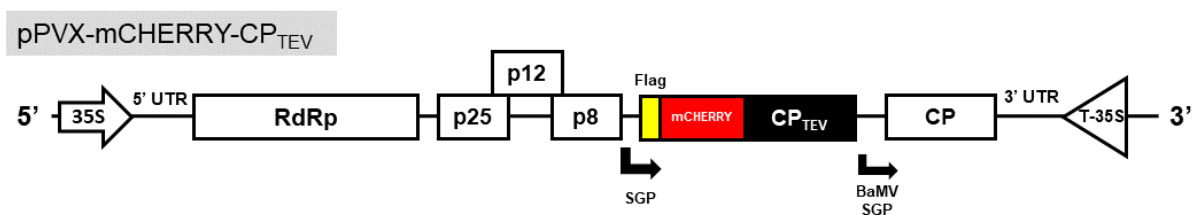


**Figura 14.** Análisis de las plantas infectadas con el vector PVX-CP<sub>TEV</sub> a los 7-15 dpi. (A) Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del cDNA tras la RT-PCR (1004 pb). (B) Detección con anticuerpo contra la CP de

TEV por Western-blot (31 kDa). (C) Detección con anticuerpo contra Flag por Western-blot (31 kDa). (D) Detección con anticuerpo contra la CP de PVX por Western-blot (25 kDa).

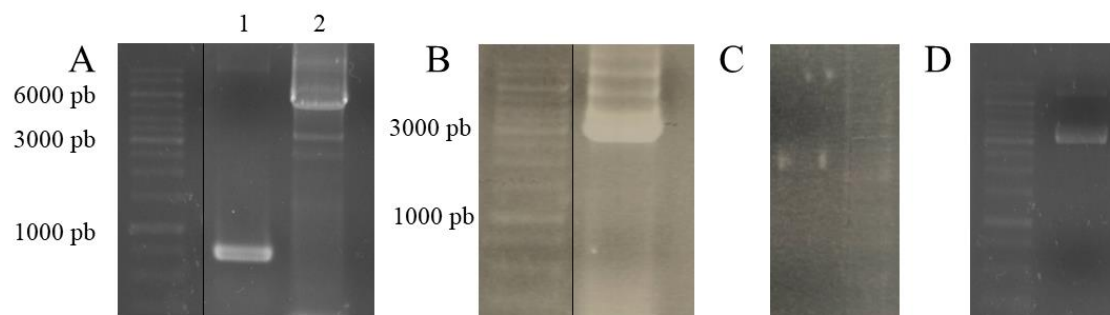
### 3. PVX como vector de expresión de proteínas de la cápside de TEV fluorescentes

Tras determinar la acción de PVX como virus complementario donador de CP de TEV, se procedió al diseño de un PVX capaz de expresar la CP<sub>TEV</sub> fusionada a la proteína fluorescente mCherry, flanqueada en el extremo 5' por la etiqueta Flag (**Figura 15**) con el objetivo final de coinfectar esta construcción junto con TEV-GFP-F2A-CP y obtener partículas de TEV recombinantes que presenten GFP y mCherry simultáneamente en la superficie del virión. Esta construcción recibirá el nombre de pPVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub>.



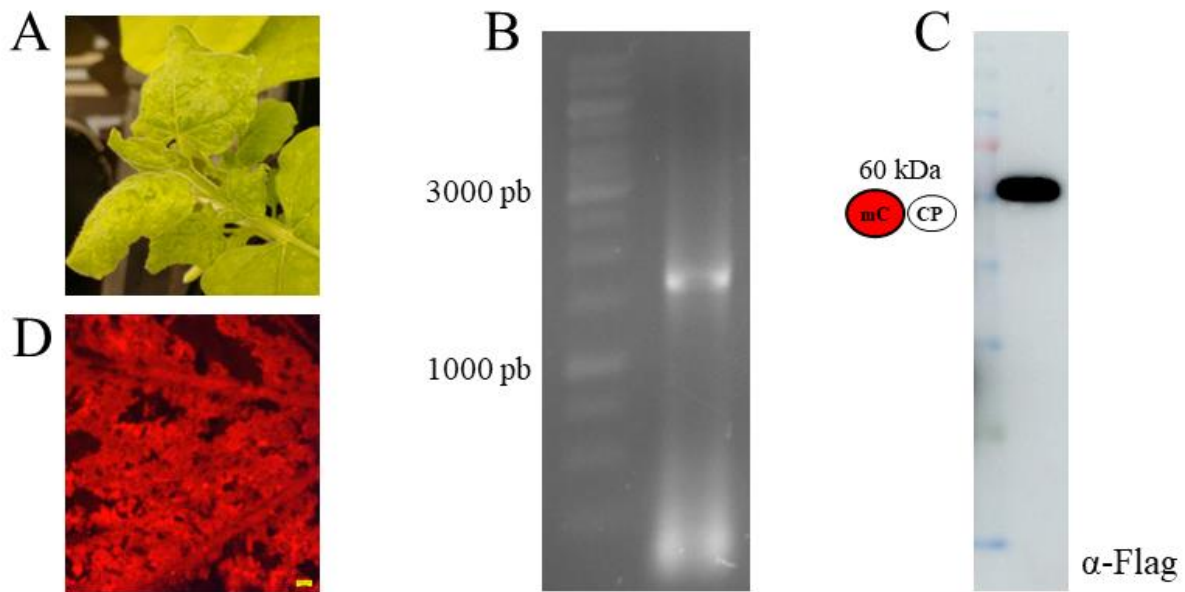
**Figura 15.** Representación esquemática del vector pPVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub>, el cual contiene el genoma completo de PVX bajo el control del promotor y terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Mediante el uso del promotor subgenómico de PVX (SGP) se produce la proteína mCherry fusionada a la CP<sub>TEV</sub>, mientras que su propia CP se produce bajo la acción del promotor subgenómico del virus del mosaico del bambú (BaMV SGP). RdRp, RNA polimerasa; p25, p12 y p8 forman un boque de tres genes que codifica proteínas involucradas en el movimiento viral; CP, proteína de cubierta.

Para la obtención de esta construcción, se emplearon los vectores pPVX-CP<sub>TEV</sub> y pGTEV-mCHERRY-F2A-CP, así como sus plásmidos intermedios, para generar los fragmentos de DNA necesarios para su construcción mediante el método de ensamblaje Gibson (**Figura 16A-D**).



**Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos generados durante el clonado de PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub>. (A) Productos de PCR para el ensamblaje en el plásmido intermediario. 1, PCR de mCherry para introducir en un plásmido intermedio (725pb); 2, PCR del plásmido intermedio para introducir mCherry (5557 pb). (B) Producto de PCR para el ensamblaje en el plásmido final PVX previamente digerido con MluI. (C-D) Electroforesis en gel de agarosa del plásmido intermedio (C) y final de PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> (D).

Una vez finalizado el clonado de esta construcción, se procedió con la realización de los experimentos para confirmar en primera instancia el correcto funcionamiento de esta construcción de forma individual. Para ello, se infectaron plantas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración con el vector pPVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> previamente introducido en *A. tumefaciens* y se recogieron muestras de hojas sintomáticas a los 7 dpi (**Figura 17A**). Dichas muestras fueron analizadas por microscopía de fluorescencia, RT-PCR y por Western-blot. Al analizarse en la lupa, pudimos observar que las plantas inoculadas con pPVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> producían satisfactoriamente fluorescencia (**Figura 17D**). Se observó por RT-PCR una banda correspondiente a 1712 pb que es el tamaño del fragmento de mCherry fusionado a la CP<sub>TEV</sub> (**Figura 17B**), lo cual indicó que el virus se estaba replicando correctamente y que la integridad del RNA viral no se había visto afectada por la secuencia introducida, ya que se había mantenido en el RNA viral intacto. Al realizar el análisis Western-blot usando el anticuerpo contra Flag, pudimos observar la presencia de una proteína de unos 60 kDa, la cual corresponde al tamaño de la proteína Flag-mCherry-CP<sub>TEV</sub> (**Figura 17C**). Estos resultados confirman que esta construcción es capaz de producir eficientemente CPs de TEV fusionadas a mCherry de manera sistémica en plantas de *N. benthamiana*.

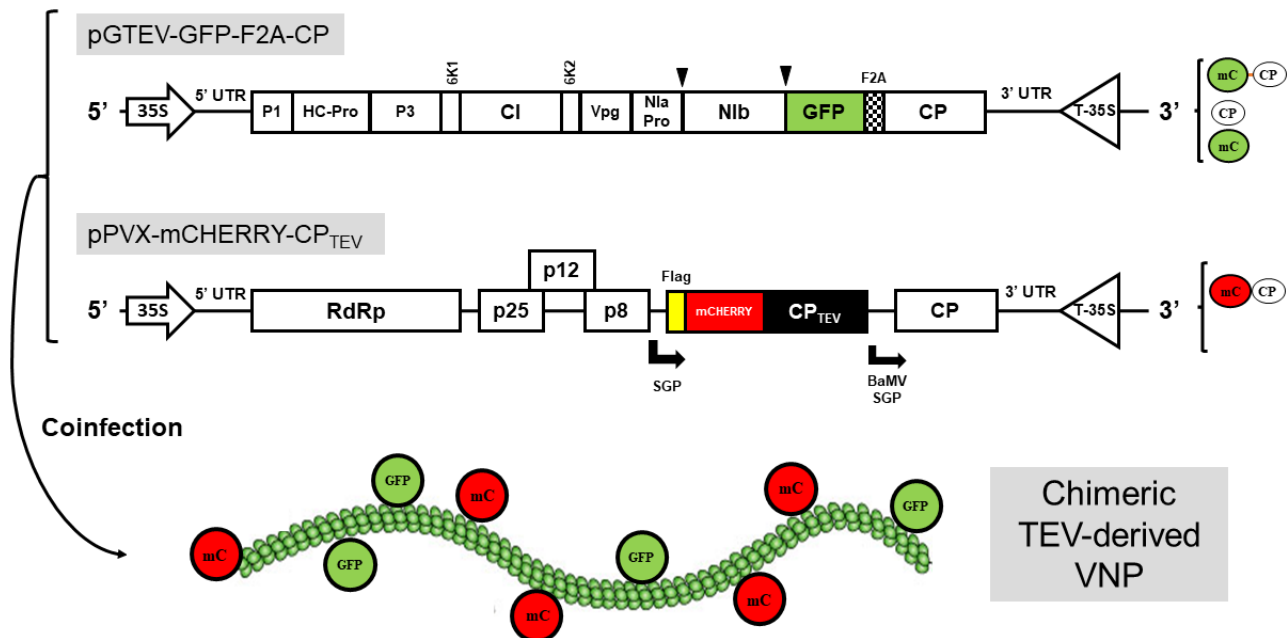


**Figura 17.** Análisis visuales y bioquímicos de plantas infectadas con el vector PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub>. **(A)** Planta de *N. benthamiana* infectada con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub>. **(B)** Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del cDNA de una muestra de hoja sintomática infectada con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> tras la RT-PCR (1712 pb). **(C)** Detección con anticuerpo contra Flag de las proteínas presentes en una muestra de hoja sintomática inoculada con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> por Western-blot (60 kDa). **(D)** Hoja infectada con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> analizada por microscopía de fluorescencia con el filtro DsRED.

#### 4. Coinfección de *N. benthamiana* con dos vectores virales basados en PVX y TEV para la producción de nanopartículas de TEV híbridas que presentan dos proteínas fluorescentes en su superficie

Tras comprobar la correcta expresión del vector pPVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub>, se procedió al objetivo final de este trabajo que es la generación de viriones de TEV recombinantes que expongan en su superficie viral proteínas fluorescentes tanto verdes como rojas, simultáneamente.

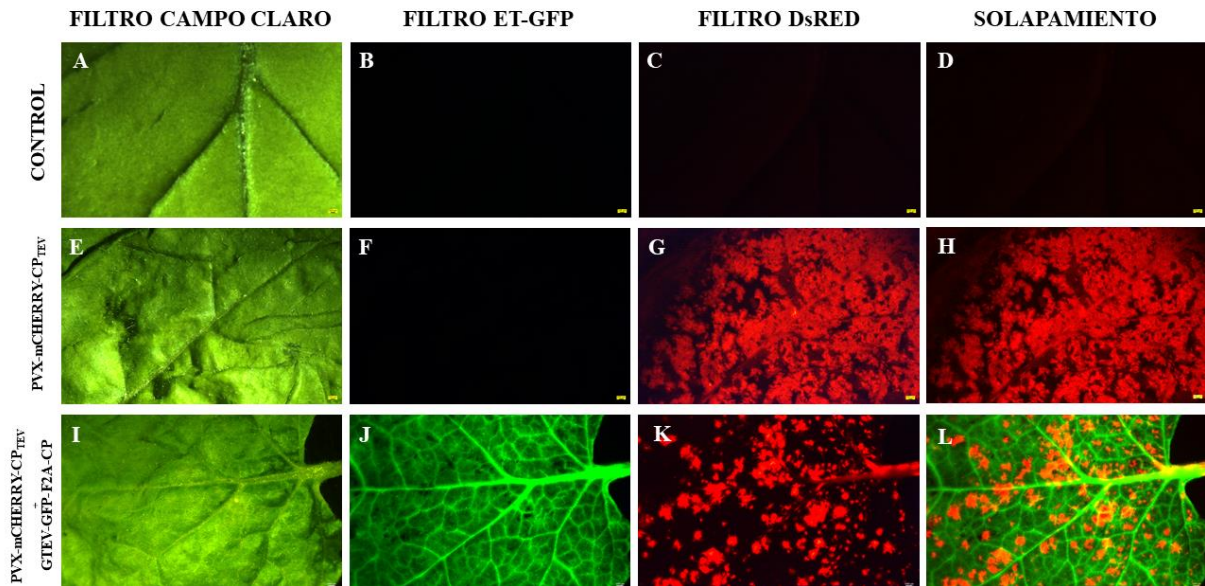
Con este objetivo, se realizó una coagroinoculación de plantas de *N. benthamiana* con el vector pGTEV-GFP-F2A-CP, el cual aporta una CP<sub>TEV</sub> fusionada la proteína fluorescente verde, y pPVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub>, el cual aporta una CP<sub>TEV</sub> fusionada a la proteína fluorescente roja (**Figura 18**). Pasados 15 dpi, se observaron síntomas en hojas apicales resultado de la infección sistémica de las plantas coinoculadas con ambos vectores. En este caso, se analizaron un total de 5 plantas diferentes que presentaron síntomas de coinfección viral.



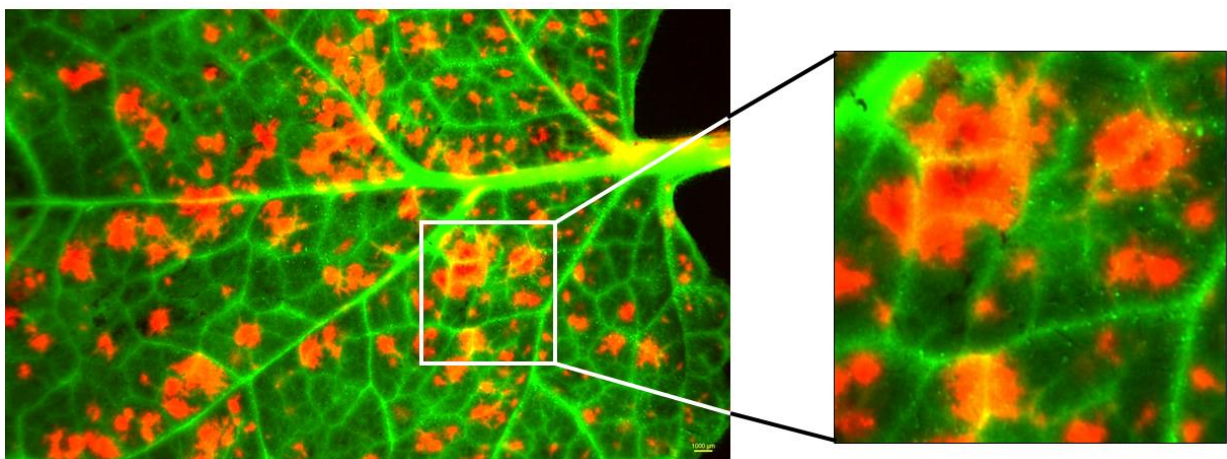
**Figura 18.** Representación esquemática de la coinfección con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> y TEV-GFP-F2A-CP, con el objetivo de formar una VNP híbrida derivada de TEV capaz de exponer diferentes proteínas fluorescentes.

Lo primero que se comprobó en este caso fue la presencia de ambas proteínas fluorescentes en las plantas que presentaban síntomas de infección viral. Por ello, las hojas tomadas fueron analizadas en la lupa observando su fluorescencia al excitarse específicamente tanto GFP como mCherry. Se observó que en el caso de plantas infectadas con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> únicamente se observaba fluorescencia cuando se excitaba con longitudes de onda específicas para mCherry y no para GFP (**Figura 19E-H**); mientras que en el caso de la coinoculación con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> y TEV-GFP-F2A-CP, esta presentaba fluorescencia tanto cuando se excitaba GFP como mCherry, lo cual demuestra que se están produciendo ambas proteínas fluorescentes en la misma hoja (**Figura 19I-K**). Al analizar las

fluorescencias simultáneamente (**Figura 19L**), se puede observar que se está produciendo una coexpresión de ambas proteínas fluorescentes en determinados puntos de la hoja (**Figura 20**).



**Figura 19.** Hojas de *N. benthamiana* analizadas por microscopía de fluorescencia. (**A-C**) Hoja control sin infectar vistas con el filtro campo claro (**A**), filtro ET-GFP (**B**) y DsRED (**C**). (**E-G**) Hoja infectada con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> vistas con el filtro campo claro (**E**), filtro ET-GFP (**F**) y DsRED (**G**). (**I-K**) Hoja coinfectada con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> y TEV-GFP-F2A-CP vistas con el filtro campo claro (**I**), filtro ET-GFP (**J**) y DsRED (**K**). (**D, H, I**) Análisis de por solapamiento de las imágenes obtenidas con los filtros ET-GFP y DsRED para la hoja sin infectar (**D**), hoja infectada con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> (**H**) y hoja coinfectada con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> y TEV-GFP-F2A-CP (**L**).

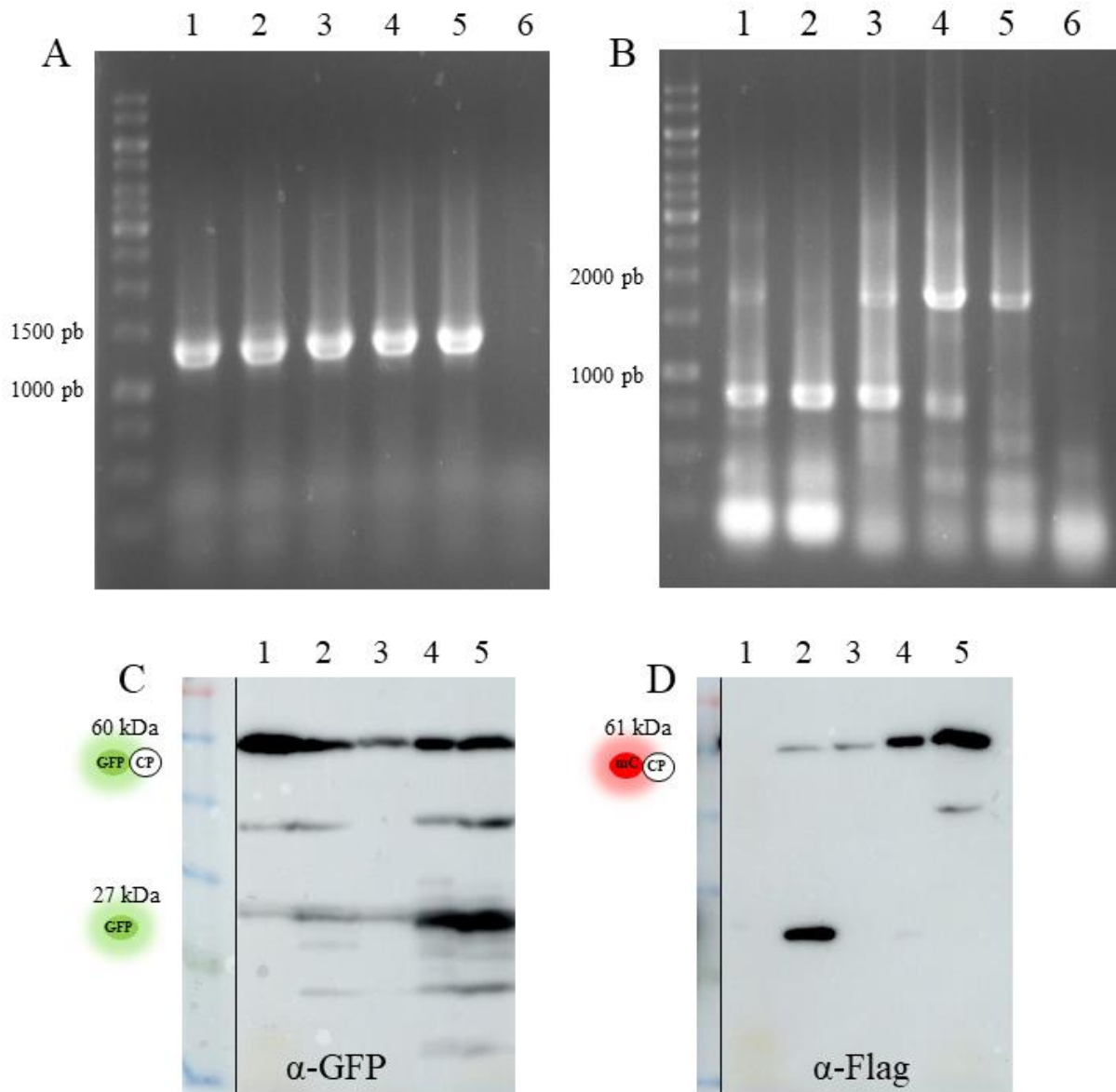


**Figura 20.** Detalle de la coexpresión de GFP y mCherry en plantas coinoculadas con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> y TEV-GFP-F2A-CP, donde se puede observar la existencia de colocación de ambas fluorescencias simultáneamente.

Tras el análisis visual, se decidió estudiar la integridad de las secuencias insertadas en el RNA viral de ambas construcciones y la correcta producción de CPs recombinantes fluorescentes. Para estos análisis, se partieron de cinco muestras procedentes de plantas coinoculadas cuya expresión de al menos un vector había sido confirmada previamente por microscopía de fluorescencia, observando fluorescencia verde y/o roja en la hoja como resultado de la excitación de GFP y mCherry, respectivamente.

Con el objetivo de analizar la estabilidad de las secuencias introducidas en el genoma viral, se realizaron dos ensayos por RT-PCR. En el primer ensayo, se determinó la estabilidad de la construcción TEV-GFP-F2A-CP, apreciándose que las cinco muestras analizadas presentaban un producto de amplificación de 1302 pb (**Figura 21A**). En el segundo ensayo, se determinó la estabilidad de la construcción PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub>. En este caso, se pudo observar que las muestras 3, 4 y 5 presentaban una banda de 1720 pb (**Figura 21B**), lo cual indicaba que el fragmento que se había introducido en el genoma de PVX se estaba replicando correctamente. Sin embargo, las muestras 1 y 2 presentaban una banda inferior a 1000 pb, lo cual podía deberse a la pérdida parcial del fragmento introducido como consecuencia de la inestabilidad del RNA viral.

Por último, se analizaron las mismas cinco muestras a nivel de proteínas, para confirmar la presencia de las CPs modificadas. Para ello se realizaron dos análisis por Western-blot. En primer lugar, se analizaron las CPs de TEV con GFP fusionadas mediante el uso de anticuerpos contra GFP (**Figura 21C**), observándose que en todas las muestras había presencia tanto de una banda correspondiente a 60 kDa, que es el tamaño de la CP fusionada a GFP; como una banda correspondiente a 27 kDa, que es el tamaño de la GFP libre producida como consecuencia del efecto de la secuencia F2A. Este resultado es coherente con los resultados obtenidos en el análisis por RT-PCR, confirmando la correcta expresión de TEV-GFP-F2A-CP en la coinfección. En segundo lugar, se analizaron las CPs de TEV que presentaban mCherry fusionadas mediante el uso de anticuerpos contra la etiqueta Flag, la cual flanqueaba el extremo N-terminal de la proteína fluorescente (**Figura 21D**). En este caso, se observó la ausencia de bandas en la primera muestra, lo cual indicaba que no se estaba expresando la proteína de interés y confirmaba lo observado anteriormente por RT-PCR. Sin embargo, en la segunda muestra sí que se observó una tenue banda correspondiente a 60 kDa, que es el tamaño de Flag-mCherry-CP<sub>TEV</sub>, seguida de una banda más intensa a la altura de 30 kDa. Esta última banda y su intensidad indican que ha ocurrido una posible pérdida de una gran parte de la proteína de interés, confirmando los análisis de RT-PCR. Por último, en las muestras 3, 4 y 5 se observó una proteína de 60 kDa, lo cual indica la correcta expresión de CPs de TEV fluorescentes por el vector PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> en la coinfección, corroborando también los resultados obtenidos en la RT-PCR.



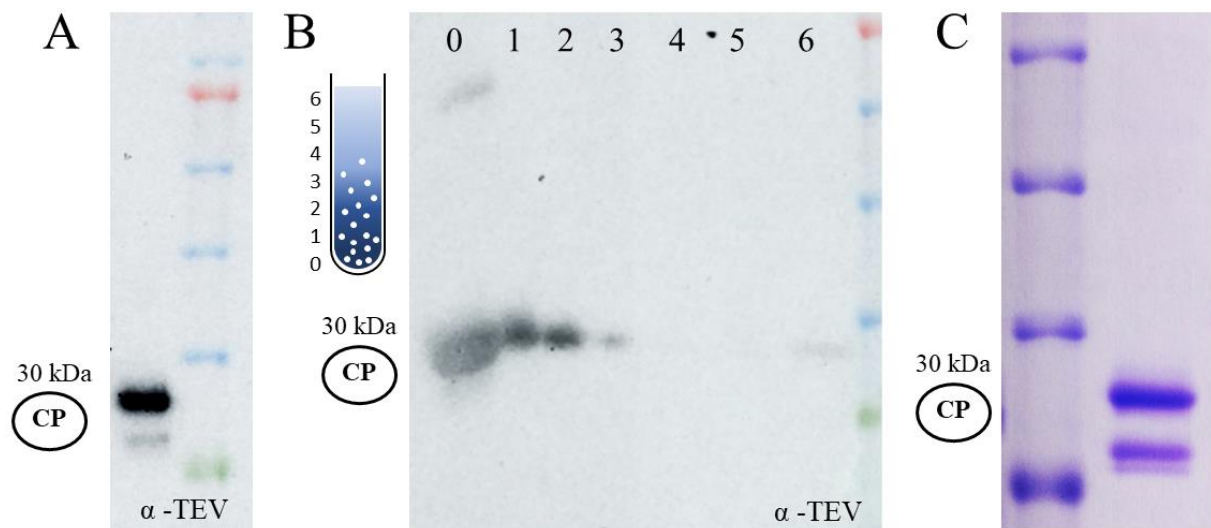
**Figura 21.** Análisis por RT-PCR y Western-blot de cinco plantas coinfectadas con los vectores PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> y TEV-GFP-F2A-CP. **(A-B)** Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del cDNA tras la RT-PCR. **(A)** RT-PCR para analizar infección con TEV (1-5, cinco muestras de hojas sintomáticas procedentes de plantas coinoculadas con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> y TEV-GFP-F2A-CP; 6: muestra de planta sin infectar). **(B)** RT-PCR para analizar infección con PVX (1-5, cinco muestras de hojas sintomáticas procedentes de plantas coinoculadas con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> y TEV-GFP-F2A-CP; 6: muestra de planta sin infectar). **(C)** Detección con anticuerpo contra GFP por Western-blot. 1-5, cinco muestras de hojas sintomáticas procedentes de plantas coinoculadas con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> y TEV-GFP-F2A-CP. **(D)** Detección con anticuerpo contra Flag por Western-blot. 1-5, cinco muestras de hojas sintomáticas procedentes de plantas coinoculadas con PVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub> y TEV-GFP-F2A-CP.



## 5. Optimización del proceso de purificación de viriones de TEV

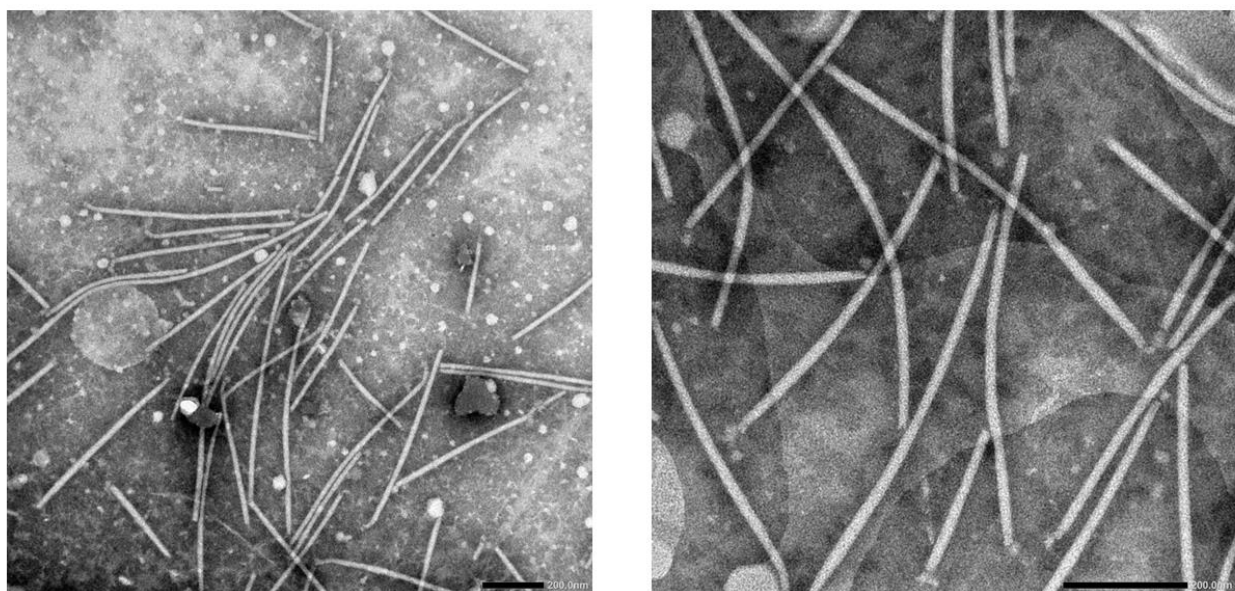
Dado la necesidad futura de purificar estas partículas virales fluorescentes, se propuso cubrir en este trabajo la optimización del proceso de purificación de viriones de TEV. Esta purificación es imprescindible para su posterior análisis por microscopía, ya que es necesario la eliminación del máximo posible de proteínas presentes en la muestra para poder observar correctamente la estructura de la partícula viral, y más si se pretende emplear dicha partícula viral posteriormente.

Dicha optimización del proceso se hizo en base a un clon infeccioso de pGTEV-GFP<sub>free</sub>. Para ello, plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con *A. tumefaciens* transformados con esta construcción y se recogieron muestras de hojas sintomáticas a los 10 dpi. Dichas muestras de distintas plantas infectadas fueron recogidas en un mismo tubo hasta tener la mayor cantidad posible, para asegurar un gran contenido en partículas virales. Antes de comenzar la purificación se comprobó por análisis Western-blot la correcta expresión de TEV usando anticuerpos contra la CP (**Figura 22A**). A continuación, se procedió a la purificación mediante los pasos detallados en los materiales y métodos, terminando con una ultracentrifugación sobre un gradiente de sacarosa. Una vez realizado este gradiente, se colectaron las distintas fracciones y se realizó un Western-blot sobre las mismas, en el que se observó que los viriones de TEV se acumularon en las primeras 3 fracciones (**Figura 22B**). Cabe destacar que en la fracción número 6 se observa la presencia de los monómeros de CP que no fueron ensamblados, demostrando que el método sirve para purificar viriones ensamblados. Las fracciones 1-3 se juntaron, se dializaron y se concentró la muestra utilizando un concentrador por centrifugación Centricon con una membrana de corte de 100 kDa. Con el objetivo final de comprobar la eficiencia de la purificación, se separó una fracción de la muestra en un gel de poliacrilamida y se realizó una tinción con azul Coomassie (**Figura 22C**), tiñéndose en el proceso todas las proteínas presentes en dicha fracción. Con esto, se observó la presencia de dos bandas, correspondientes a un tamaño aproximado de 30 kDa o inferior. La banda superior corresponde a la proteína CP de TEV, lo cual indica que se ha conseguido purificar satisfactoriamente las partículas virales de TEV. Sin embargo, la banda inferior puede deberse a CPs que han sido parcialmente dañadas durante el propio transporte en el gel de acrilamida, a CPs dañadas que han sido capaces de ensamblarse en la partícula viral o, la más probable, a productos de degradación generados por roturas de la estructura viral durante los últimos pasos de la purificación.



**Figura 22.** Análisis bioquímico de plantas inoculadas con el vector pGTEV-GFP<sub>free</sub>. **(A)** Detección con anticuerpo contra TEV de las proteínas extraídas de las muestras de hojas infectadas con TEV-GFP<sub>free</sub> por Western-blot (30 kDa, correspondiente al tamaño de la CP de TEV). **(B)** Detección con anticuerpo contra la CP de TEV por Western-blot de las proteínas purificadas en cada una de las fases del gradiente de sacarosa (banda de 30 kDa correspondiente al tamaño de la CP de TEV). **(C)** Tinción con azul de Coomassie del gel de acrilamida 12% resultante de la electroforesis con la muestra purificada (banda de 30 kDa correspondiente al tamaño de la CP de PVX).

Finalmente, una vez realizada la purificación, se realizó el último paso del proceso, la observación de las partículas virales por microscopía electrónica. Mediante este proceso, se pudo contemplar la estructura de viriones de TEV, observándose nanopartículas filamentosas y flexuosas del tamaño esperado (700 nm) (**Figura 23**).



**Figura 23.** Imágenes TEM de partículas virales de TEV purificadas a partir de tejido infectado de *N. benthamiana*. Las barras de escala indican un tamaño de 200 nm.

## DISCUSIÓN

Más de cien años de investigación sobre virus de plantas han permitido una comprensión detallada de la replicación viral y de las interacciones huésped-virus, lo cual ha permitido el desarrollo de vectores virales con el objetivo de satisfacer algunas de las necesidades de la biotecnología (Wang et al., 2020). En la actualidad, los virus de plantas son empleados en una gran variedad de aplicaciones diferentes, desde la producción de moléculas de interés hasta su uso como vectores en edición genética CRISPR-Cas. Sin embargo, en esta última década, se está generando un gran interés por el uso de los virus como nanopartículas, debido a su gran abanico de aplicaciones potenciales destacadas en la **Figura 3**. Algunos de los virus más usados hasta la fecha como nanopartículas son TMV, uno de los virus de plantas más estudiados y del que más conocimiento se tiene; CPMV, el cual destaca por su estudiada estructura icosaédrica y a sus aplicaciones en el campo de los nanomateriales; y PVX, un virus filamentosos cuyas amplias aplicaciones en el campo de la medicina, tales como su uso como *scaffold* vacunal o biosensor, entre otras; han ganado mucha repercusión en los últimos años. Sin embargo, virus pertenecientes al género *Potyvirus* han sido muy poco estudiados en este área, destacando únicamente el uso de nanopartículas derivadas del virus del mosaico del nabo (TuMV) (Cuenca et al., 2016; Frías-Sánchez et al., 2021). Por este motivo, en este trabajo se decidió desarrollar el uso de otro potyvirus, el TEV, como nanopartícula viral presentadora de proteínas recombinantes de interés sobre su superficie.

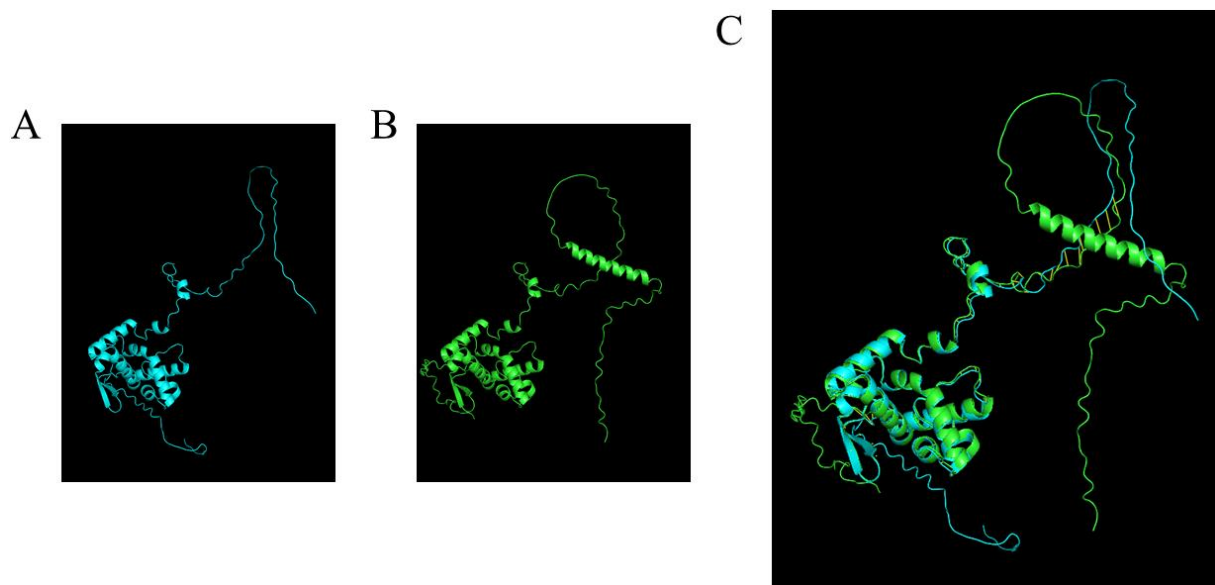
Tomando como referencia el trabajo de Shukla et al., 2014, en el cual se ingenierizó un clon infeccioso de PVX para presentar proteínas fluorescentes en su superficie, diseñamos cuatro construcciones de TEV que presentaban las proteínas fluorescentes GFP o mCherry como fusiones al extremo N-terminal de la proteína CP. En dos de las cuatro construcciones introdujimos la secuencia de escape ribosomal F2A procedente del FMDV (Ryan and Drew, 1994), la cual se había observado en estudios previos con otros vectores virales que generan una mezcla de CPs fusionadas a la proteína fluorescente así como CPs libres, en una ratio variable. En nuestro trabajo, hemos observado que las construcciones de TEV que no presentaban esta secuencia F2A no eran capaces de mantener la capacidad infectiva del virus y ni siquiera era capaces de generar CPs recombinantes, lo cual está en consonancia con lo observado en otros trabajos para TMV (Röder et al., 2017a), donde se concluyó que el uso de la secuencia F2A era prácticamente imprescindible para que la estructura del virión fuese estable en el caso de fusionar proteínas de gran tamaño a la cápside viral. En el caso de PVX, se ha observado que la estabilidad del virión recombinante dependía principalmente de las características fisicoquímicas de la proteína fusionada, tales como el punto isoeléctrico (observándose un rango de tolerancia de entre 5.2 y 9.2) o la distribución de cargas y su posible interacción con las cargas del virión (Lico et al., 2006). Además, hasta el momento el rango máximo reportado de tolerancia de una proteína fusionada directamente a la CP sin la presencia de la secuencia F2A es de máximo 13.5 kDa (Röder et al., 2018). Los resultados obtenidos, en la línea con las investigaciones previas mencionadas, corroboran

la eficiencia del uso de la secuencia F2A en TEV como un elemento imprescindible para la generación de nanopartículas recombinantes en el caso de fusionar proteínas de gran tamaño a la CP (como es nuestro caso, ya que tanto GFP como mCherry tienen un tamaño aproximado de unos 30 kDa). En las construcciones donde sí se incluyó la secuencia F2A, comprobamos que los clones eran estables, mantenían su capacidad infectiva y la proteína fluorescente fusionada a la CP estaba presente y activa. Aun así, no podríamos confirmar la obtención de nanopartículas de TEV fluorescentes hasta su posterior análisis por microscopía electrónica y por inmunotinción contra GFP o mCherry. Con resultados positivos de estos experimentos, sí seríamos capaces de confirmar que hemos sido capaces de generar por primera vez partículas virales de TEV que exponen tanto una como varias proteínas recombinantes en su superficie. Estos análisis se están llevando a cabo en el momento de la entrega de esta memoria.

Tras ello, proseguimos este trabajo con el objetivo de generar partículas virales híbridas, capaces de presentar dos proteínas fluorescentes diferentes en un mismo virión. Para ello, nos basamos en un método de coinfección con virus sinérgicos, es decir una pareja de virus no excluyentes entre sí y que por lo tanto son capaces de coinfectar la misma célula a la vez, incluso alcanzando niveles de replicación más altos que por sí solos (Bowman Vance et al., 1995). Uno de los sistemas de coinfección usados en otros trabajos fue el empleo de PVX y TMV, con el fin de generar viriones de PVX que presentaran dos proteínas fluorescentes en la misma nanopartícula viral (Dickmeis et al., 2015). En este trabajo, con el fin de generar partículas híbridas de TEV, se empleó un sistema de coinfección junto a PVX, el cual ya había sido descrito previamente en el grupo de investigación como un virus compatible con TEV (Uranga et al., 2021c). Con este objetivo en mente, primero decidimos comprobar la capacidad de PVX para producir cápsides de TEV, tanto sin modificar como con mCherry fusionada. Obtuvimos resultados positivos, ya que vimos que PVX era capaz de mantener su infectividad a la vez que producía las proteínas de la cápside de TEV.

Una vez demostrado la capacidad de PVX para producir CPs recombinantes de TEV, procedimos a realizar ensayos de coinfección empleando el vector pGTEV-GFP-F2A-CP, el cual aportaba una proteína fluorescente verde, y pPVX-mCHERRY-CP<sub>TEV</sub>, el cual aportaba una proteína fluorescente roja. En la construcción de PVX decidimos no añadir la secuencia F2A debido a que el vector TEV-GFP-F2A-CP ya era capaz de aportar las CP sin modificar, por lo que durante el ensamblaje de la partícula viral ya había una mezcla de CPs modificadas y sin modificar. Como resultado hemos podido demostrar que la coinfección de ambos vectores virales da lugar a la coexpresión de dos CP<sub>TEV</sub> distintas fusionadas a GFP o mCherry en la misma muestra de tejido, confirmando de esta manera la compatibilidad de ambos y en particular la capacidad de PVX de aportar la CP<sub>TEV</sub>. Sin embargo, sería necesario confirmar mediante el uso de microscopía confocal que existe colocalización de ambos vectores virales en la misma célula, lo cual podría suponer el posible ensamblaje de ambas CPs fluorescentes en el mismo virión. Analizando un poco más en detalle los resultados, hemos observado que en dos de las cinco

plantas coinfectadas con ambos vectores se perdió parcialmente el fragmento introducido en PVX, correspondiente a mCherry-CP<sub>TEV</sub>. Atendiendo a los resultados obtenidos en el Western-blot empleando el anticuerpo contra la etiqueta Flag, podemos intuir que la primera planta perdió un fragmento del extremo 5' de la secuencia introducida, ya que no se detecta la presencia de Flag; sin embargo, en la segunda planta podemos intuir que el fragmento que se ha perdido no corresponde al extremo 5', ya que si observamos la presencia Flag al observar banda (**Figura 21D**). Esto puede deberse principalmente a las diferencias entre TEV y PVX respecto a sus los tiempos de infección, siendo los de PVX notablemente más cortos, es decir, PVX consigue infectar la planta en un menor tiempo que TEV. Como se observó en trabajos anteriores, la inestabilidad genética de clones de PVX fluorescentes se hacía notable a los 25 dpi (Shukla et al., 2014), observándose que a partir de ese momento PVX perdía la fluorescencia. Por este motivo, ha sido reportado que el momento óptimo de recogida de material debe ser entre los 14 y los 21 dpi, asegurando la máxima superficie infectada sin que se vea afectada la estabilidad del virus. Sin embargo, estos tiempos se retrasan en TEV, lo que puede provocar que en momentos en los que TEV se esté expresando correctamente, PVX pueda no ser estable y, por tanto, no se consiga una coinfección satisfactoria. Por este motivo, en un futuro se tendrá que poner a punto este proceso, ya sea recogiendo muestra a tiempos más tempranos o realizando una coinfección seriada, en la cual primero se infecte con TEV y, días después con PVX, con el objetivo de sincronizar sus tiempos de infección y maximizar la superficie de la planta coinfectada. Además de la diferencia de tiempos de infección, hay que tener en cuenta la estabilidad del virión en cuanto a su estructura, como hemos mencionado anteriormente. Se ha observado que la estructura viral de los potyvirus está fuertemente ligada al genoma viral (Cuesta et al., 2019). En particular, se ha visto que para TuMV la estructura del virion se ve afectada si el ensamblado de la partícula a partir de monómeros de CP se realiza en ausencia del genoma viral, observándose viriones más rígidos y pequeños. Estas observaciones podrían extrapolarse también a TEV, debido a las grandes similitudes estructurales de sus proteínas de cubierta (**Figura 22**). Es por ello que, tanto la modificación del genoma viral al introducir secuencias nucleotídicas como la modificación de las proteínas de cubierta al fusionarle otras proteínas en su extremo N-terminal podrían afectar a la estructura del virión y, por tanto, a su estabilidad.



**Figura 22.** Predicción de la estructura tridimensional de las proteínas de la cápside de TEV (A) y TUMV (B) mediante el programa bioinformático AlphaFold 2. (C) Alineamiento de las estructuras de las proteínas de la cápside de TEV y TuMV mostrando un alto grado de similitud entre ambas.

Tras analizar todos los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que hemos sido capaces de generar proteínas de la cápside de TEV fusionadas a proteínas fluorescentes con éxito, pero no podemos confirmar la obtención de nanopartículas de TEV que expongan dichas proteínas fluorescente en el exterior de su estructura viral.

Debido a la necesidad final de purificar las partículas virales de TEV, se decidió perfeccionar un protocolo de purificación, paso limitante en la producción de nanopartículas virales de plantas. Aunque ya hay descritos protocolos de purificación de TEV, dichos protocolos han quedado desactualizados al ser demasiado complejos. Por este motivo, decidimos partir de un protocolo más actual de purificación de PVX (Shukla et al., 2018), al cual le realizamos diferentes modificaciones. Por un lado, sustituimos la precipitación del virus con PEG por una sedimentación por ultracentrifugación y, por otro lado, aumentamos la concentración de sacarosa usada en el gradiente, debido a que TEV presenta un mayor tamaño que PVX. Con estas modificaciones, conseguimos obtener un protocolo eficaz y relativamente sencillo para purificar nanopartículas virales de TEV.

Finalmente, en un futuro tendremos que evaluar mediante diversos ensayos si las partículas virales purificadas a partir de la coinfección con TEV y PVX son capaces de exponer al mismo tiempo dos proteínas de interés distintas en su superficie. Para ello hemos pensado distintos ensayos que podríamos realizar con tal fin. En primer lugar, haremos un análisis Western-blot sobre la fracción con las nanopartículas purificadas y trataremos de detectar tanto GFP como mCherry, lo cual indicaría que ambas están formando parte de los viriones. A su vez, trataremos de detectar ambas señales de fluorescencia en dicha fracción purificada. Por otro lado, con el fin de tener una prueba aún más

estructural, haremos una inmunotinción con anticuerpos específicos para cada proteína fluorescente acoplados a partículas de oro de distinto tamaño y analizaremos la tinción por microscopía electrónica de transmisión. El objetivo a largo plazo de este trabajo es convertir las nanopartículas de TEV en una herramienta biotecnológica, lo cual presenta una inmensa cantidad de posibles aplicaciones en la biotecnología y, en concreto, en medicina. Las propias nanopartículas generadas en este trabajo se podrían evaluar como sondas ópticas para el marcaje de tumores, como reportó en trabajos anteriormente descritos en PVX (Shukla et al., 2014). Estas nanopartículas fluorescentes podrían mejorarse aun mediante la presentación en la superficie viral tanto de una proteína fluorescente como de un anticuerpo específico contra algún subtipo celular de interés, lo cual permitiría mejorar la sensibilidad y el reconocimiento de dichas células, al igual que permitiría su análisis *in vivo*. Otras posibles aplicaciones radican en la naturaleza de las proteínas que se exponen en la superficie viral, ya que, si se exponen antígenos de algún virus infeccioso en humanos, dicha nanopartícula viral podría emplearse como vacuna; o si se exponen anticuerpos específicos contra antígenos de interés, se podrán desarrollar nanopartículas capaces de detectarlos en ensayos diagnósticos. Por estos motivos, el desarrollo de una nueva nanopartícula viral abre la puerta al desarrollo de infinidad de aplicaciones biotecnológicas, tan demandadas en la sociedad actual.

## CONCLUSIONES

1. Se han construido con éxito dos vectores virales derivados del TEV que llevan fusionados en el extremo 5' de la secuencia de CP las secuencias de GFP o mCherry respectivamente, seguidas de la secuencia F2A.
2. Los vectores virales diseñados son capaces de infectar eficazmente plantas de *Nicotiana benthamiana* y de generar proteínas de cápside recombinantes que presentan fusionadas proteínas fluorescentes como GFP o mCherry en la progenie viral.
3. Se han diseñado vectores virales basados en PVX con la capacidad de producir la CP de TEV de manera eficaz en plantas de *Nicotiana benthamiana*, tanto sin modificar como fusionándole la proteína fluorescente mCherry.
4. Mediante la coinfección con dos virus compatibles (TEV y PVX), se ha conseguido observar la coexpresión de CPs fusionadas a las proteínas fluorescentes GFP y mCherry en una misma hoja.
5. Se ha optimizado un protocolo de purificación eficiente de partículas virales de TEV, las cuales han sido visualizadas por microscopía electrónica de transmisión. Queda pendiente en un futuro próximo analizar las nanopartículas generadas en este trabajo mediante microscopía electrónica e inmunotinción, con el objetivo final de demostrar que se han generado exitosamente nanopartículas de TEV que presenten proteínas fluorescentes en su superficie.



# BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamian, P., Hammond, R.W., Hammond, J., 2020. Plant Virus–Derived Vectors: Applications in Agricultural and Medical Biotechnology. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-010720-054958> 7, 513–535. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-010720-054958>
- Bao, W., Cao, B., Zhang, Y., Wuriyangan, H., 2016. Silencing of *Mythimna separata* chitinase genes via oral delivery of in planta-expressed RNAi effectors from a recombinant plant virus. *Biotechnology Letters* 38, 1961–1966. <https://doi.org/10.1007/S10529-016-2186-0/FIGURES/4>
- Barón, M., Pineda, M., Pérez-Bueno, M.L., 2016. Picturing pathogen infection in plants. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 71, 355–368. <https://doi.org/10.1515/ZNC-2016-0134/PDF>
- Bawden, F.C., Kassanis, B., 1941. SOME PROPERTIES OF TOBACCO ETCH VIRUSES. *Annals of Applied Biology* 28, 107–118. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7348.1941.TB07544.X>
- Bedoya, L., Martínez, F., Rubio, L., Daròs, J.A., 2010a. Simultaneous equimolar expression of multiple proteins in plants from a disarmed potyvirus vector. *Journal of Biotechnology* 150, 268–275. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2010.08.006>
- Bedoya, L., Martínez, F., Rubio, L., Daròs, J.A., 2010b. Simultaneous equimolar expression of multiple proteins in plants from a disarmed potyvirus vector. *Journal of Biotechnology* 150, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.08.006>
- Bedoya, L.C., Daròs, J.A., 2010. Stability of Tobacco etch virus infectious clones in plasmid vectors. *Virus Research* 149, 234–240. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2010.02.004>
- Bedoya, L.C., Martínez, F., Orzáez, D., Daròs, J.A., 2012. Visual Tracking of Plant Virus Infection and Movement Using a Reporter MYB Transcription Factor That Activates Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Physiology* 158, 1130–1138. <https://doi.org/10.1104/PP.111.192922>
- Bendandi, M., Marillonnet, S., Kandzia, R., Thieme, F., Nickstadt, A., Herz, S., Fröde, R., Inogés, S., Lòpez-Díaz de Cerio, A., Soria, E., Villanueva, H., Vancanneyt, G., McCormick, A., Tusé, D., Lenz, J., Butler-Ransohoff, J.E., Klimyuk, V., Gleba, Y., 2010. Rapid, high-yield production in plants of individualized idiotypic vaccines for non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology* 21, 2420–2427. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDQ256>
- Bowman Vance, V., Berger, P.H., Carrington, J.C., Hunt, A.G., Ming Shi, X., 1995. 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 206, 583–590. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(95\)80075-1](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(95)80075-1)
- Breman, L.L., 1987. Tobacco Etch Virus. *Plant Pathology Circular* 297.
- Buyel, J.F., 2019. Plant molecular farming – Integration and exploitation of side streams to achieve sustainable biomanufacturing. *Frontiers in Plant Science* 9, 1893. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01893/BIBTEX>
- Buyel, J.F., Fischer, R., 2012. Predictive models for transient protein expression in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) can optimize process time, yield, and downstream costs. *Biotechnology and Bioengineering* 109, 2575–2588. <https://doi.org/10.1002/BIT.24523>
- Carbonell, A., Maliogka, V.I., de Jesús Pérez, J., Salvador, B., León, D.S., García, J.A., Simón-Mateo, C., 2013. Diverse Amino Acid Changes at Specific Positions in the N-Terminal Region of the Coat Protein Allow Plum pox virus to Adapt to New Hosts. *Am Phytopath Society* 26, 1211–1224. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-13-0093-R>
- Chariou, P.L., Dogan, A.B., Welsh, A.G., Saidel, G.M., Baskaran, H., Steinmetz, N.F., 2019. Soil mobility of synthetic and virus-based model nanopesticides. *Nature Nanotechnology* 2019 14:7 14, 712–718. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0453-7>
- Charlton Hume, H.K., Vidigal, J., Carrondo, M.J.T., Middelberg, A.P.J., Roldão, A., Lua, L.H.L., 2019. Synthetic biology for bioengineering virus-like particle vaccines. *Biotechnology and Bioengineering* 116, 919–935. <https://doi.org/10.1002/BIT.26890>
- Comellas-Aragonès, M., Engelkamp, H., Claessen, V.I., Sommerdijk, N.A.J.M., Rowan, A.E., Christianen, P.C.M., Maan, J.C., Verduin, B.J.M., Cornelissen, J.J.L.M., Nolte, R.J.M., 2007. A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nature Nanotechnology* 2:10 2, 635–639. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.299>
- Cordero, T., Rosado, A., Majer, E., Jaramillo, A., Rodrigo, G., Daròs, J.A., 2018. Boolean Computation in Plants Using Post-translational Genetic Control and a Visual Output Signal. *ACS Synthetic Biology* 7, 2322–2330. [https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.8B00214/SUPPL\\_FILE/SB8B00214\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.8B00214/SUPPL_FILE/SB8B00214_SI_001.PDF)
- Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T., Wang, A., Laliberté, J.-F., 2009. Turnip Mosaic Virus RNA Replication Complex Vesicles Are Mobile, Align with Microfilaments, and Are Each Derived from a Single Viral Genome. *Journal of Virology* 83, 10460–10471. [https://doi.org/10.1128/JVI.00819-09/SUPPL\\_FILE/SUPPLEMENTAL\\_MOVIE\\_DATA.ZIP](https://doi.org/10.1128/JVI.00819-09/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTAL_MOVIE_DATA.ZIP)
- Cuenca, S., Mansilla, C., Aguado, M., Yuste-Calvo, C., Sánchez, F., Sánchez-Montero, J.M., Ponz, F., 2016. Nanonets derived from turnip mosaic virus as scaffolds for increased enzymatic activity of immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Frontiers in Plant Science* 7, 464. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00464/BIBTEX>
- Cuesta, R., Yuste-Calvo, C., Gil-Cartón, D., Sánchez, F., Ponz, F., Valle, M., 2019. Structure of Turnip mosaic virus and its viral-like particles. *Scientific Reports* 2019 9:1 9, 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51823-4>

- de Ruiter, M. v., Putri, R.M., Cornelissen, J.J.L.M., 2018. CCMV-Based Enzymatic Nanoreactors. *Methods in Molecular Biology* 1776, 237–247. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7808-3\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7808-3_16)
- Dickmeis, C., Honickel, M.M.A., Fischer, R., Commandeur, U., 2015. Production of hybrid chimeric PVX particles using a combination of TMV and PVX-based expression vectors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3, 189. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2015.00189/BIBTEX>
- EM Johnson, 1930. Virus diseases of Tobacco in Kentucky. *Bulletin. Kentucky Agricultural Experiment.*
- F. Buyel, J., 2015. Process Development Strategies in Plant Molecular Farming. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 16, 966–982.
- Ferrer-Miralles, N., Rodríguez-Carmona, E., Corchero, J.L., García-Fruitós, E., Vázquez, E., Villaverde, A., 2015. Engineering protein self-assembling in protein-based nanomedicines for drug delivery and gene therapy. *Critical Reviews in Biotechnology* 35, 209–221. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.833163>
- Fraenkel-Conrat, H., Williams, R.C., 1955. RECONSTITUTION OF ACTIVE TOBACCO MOSAIC VIRUS FROM ITS INACTIVE PROTEIN AND NUCLEIC ACID COMPONENTS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 41, 690. <https://doi.org/10.1073/PNAS.41.10.690>
- Frías-Sánchez, A.I., Quevedo-Moreno, D.A., Samandari, M., Tavares-Negrete, J.A., Sánchez-Rodríguez, V.H., González-Gamboa, I., Ponz, F., Alvarez, M.M., Trujillo-De Santiago, G., 2021. Biofabrication of muscle fibers enhanced with plant viral nanoparticles using surface chaotic flows. *Biofabrication* 13, 035015. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ABD9D7>
- Gengenbach, B.B., Keil, L.L., Opdensteinen, P., Müschen, C.R., Melmer, G., Lentzen, H., Bührmann, J., Buyel, J.F., 2019. Comparison of microbial and transient expression (tobacco plants and plant-cell packs) for the production and purification of the anticancer mistletoe lectin viscumin. *Biotechnology and Bioengineering* 116, 2236–2249. <https://doi.org/10.1002/BIT.27076>
- Gibbs, A., Ohshima, K., 2010. Potyviruses and the Digital Revolution. *Annual Review of Phytopathology* 48, 205–223. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYTO-073009-114404>
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* 2009 6:5 6, 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- 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 Biotechnology Journal* 3, 613–620. <https://doi.org/10.1111/J.1467-7652.2005.00154.X>
- Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., van Eldik, G., Botterman, J., Klimyuk, V., Gleba, Y., 2006. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 14701–14706. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0606631103>
- Gleba, Y., Klimyuk, V., Marillonnet, S., 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 134–141. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2007.03.002>
- Gleba, Y.Y., Tusé, D., Giritch, A., 2013. Plant Viral Vectors for Delivery by Agrobacterium. *Plant Viral Vectors* 155–192. [https://doi.org/10.1007/82\\_2013\\_352](https://doi.org/10.1007/82_2013_352)
- Gobeil, P., Pillet, S., Séguin, A., Boulay, I., Mahmood, A., Vinh, D.C., Charland, N., Boutet, P., Roman, F., van der 4 Most, R., de Los, M., Ceregido Perez, A., Ward, B.J., Landry, N., 2021. Interim Report of a Phase 2 Randomized Trial of a Plant-Produced Virus-Like Particle Vaccine for Covid-19 in Healthy Adults Aged 18-64 and Older Adults Aged 65 and Older. *medRxiv* 2021.05.14.21257248. <https://doi.org/10.1101/2021.05.14.21257248>
- Goeddel, D. v., Heyneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R., Seeburg, P.H., 1979. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 1979 281:5732 281, 544–548. <https://doi.org/10.1038/281544a0>
- Goeddel, D. v., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirosef, T., Kraszewskit, A., Itakuraf, K., Riggstt, A.D., 1979. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 106–110. <https://doi.org/10.1073/PNAS.76.1.106>
- Grabowski, G.A., Golembo, M., Shaaltiel, Y., 2014. Taliglucerase alfa: An enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Molecular Genetics and Metabolism* 112, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2014.02.011>
- Grgacic, E.V.L., Anderson, D.A., 2006. Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods* 40, 60–65. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2006.07.018>
- Hajeri, S., Killiny, N., El-Mohtar, C., Dawson, W.O., Gowda, S., 2014. Citrus tristeza virus-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). *Journal of Biotechnology* 176, 42–49. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2014.02.010>
- Hanania, U., Ariel, T., Tekoah, Y., Fux, L., Sheva, M., Gubbay, Y., Weiss, M., Oz, D., Azulay, Y., Turbovski, A., Forster, Y., Shaaltiel, Y., 2017. Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant-specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins. *Plant Biotechnology Journal* 15, 1120–1129. <https://doi.org/10.1111/PBI.12702>
- Harahap-Carrillo, I.S., Ceballos-Olvera, I., Reyes-del Valle, J., 2015. Immunogenic Subviral Particles Displaying Domain III of Dengue 2 Envelope Protein Vected by Measles Virus. *Vaccines* 2015, Vol. 3, Pages 503-518 3, 503–518. <https://doi.org/10.3390/VACCINES3030503>

- He, Y., Wang, K., Yan, N., 2014. The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins. *Protein & Cell* 658–672. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0086-4>
- Hiebert, E., Purcifull, D.E., Christie, R.G., Christie, S.R., 1971. Partial purification of inclusions induced by tobacco etch virus and potato virus Y. *Virology* 43, 638–646. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(71\)90288-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90288-1)
- Jansing, J., Sack, M., Augustine, S.M., Fischer, R., Bortesi, L., 2019. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking  $\beta$ -1,2-xylose and core  $\alpha$ -1,3-fucose. *Plant Biotechnology Journal* 17, 350–361. <https://doi.org/10.1111/PBI.12981>
- Jegerlehner, A., Zabel, F., Langer, A., Dietmeier, K., Jennings, G.T., Saudan, P., Bachmann, M.F., 2013. Bacterially Produced Recombinant Influenza Vaccines Based on Virus-Like Particles. *PLOS ONE* 8, e78947. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0078947>
- Kovalskaya, N.Y., Herndon, E.E., Foster-Frey, J.A., Donovan, D.M., Hammond, R.W., 2019. Antimicrobial activity of bacteriophage derived triple fusion protein against *Staphylococcus aureus*. *AIMS Microbiology* 5, 158. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2019.2.158>
- Lauria, I., Dickmeis, C., Röder, J., Beckers, M., Rütten, S., Lin, Y.Y., Commandeur, U., Fischer, H., 2017. Engineered Potato virus X nanoparticles support hydroxyapatite nucleation for improved bone tissue replacement. *Acta Biomaterialia* 62, 317–327. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2017.08.039>
- Le, D.H.T., Hu, H., Commandeur, U., Steinmetz, N.F., 2017a. Chemical addressability of potato virus X for its applications in bio/nanotechnology. *Journal of Structural Biology* 200, 360–368. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2017.06.006>
- Le, D.H.T., Lee, K.L., Shukla, S., Commandeur, U., Steinmetz, N.F., 2017b. Potato virus X, a filamentous plant viral nanoparticle for doxorubicin delivery in cancer therapy. *Nanoscale* 9, 2348–2357. <https://doi.org/10.1039/C6NR09099K>
- Lebel, M.É., Chartrand, K., Tarrab, E., Savard, P., Leclerc, D., Lamarre, A., 2016. Potentiating Cancer Immunotherapy Using Papaya Mosaic Virus-Derived Nanoparticles. *Nano Letters* 16, 1826–1832. [https://doi.org/10.1021/ACS.NANOLETT.5B04877/SUPPL\\_FILE/NL5B04877\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACS.NANOLETT.5B04877/SUPPL_FILE/NL5B04877_SI_001.PDF)
- Lerich, A., Langhans, M., Sturm, S., Robinson, D.G., 2011. Is the 6 kDa tobacco etch viral protein a bona fide ERES marker? *Journal of Experimental Botany* 62, 5013–5023. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERR200>
- Li, F., Wang, A., 2019. RNA-Targeted Antiviral Immunity: More Than Just RNA Silencing. *Trends in Microbiology* 27, 792–805. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2019.05.007>
- Lico, C., Capuano, F., Renzone, G., Donini, M., Marusic, C., Scaloni, A., Benvenuto, E., Baschieri, S., 2006. Peptide display on Potato virus X: Molecular features of the coat protein-fused peptide affecting cell-to-cell and phloem movement of chimeric virus particles. *Journal of General Virology* 87, 3103–3112. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.82097-0/CITE/REFWORKS>
- Madeira, L.M., Szeto, T.H., Henquet, M., Raven, N., Runions, J., Huddleston, J., Garrard, I., Drake, P.M.W., Ma, J.K.C., 2016a. High-yield production of a human monoclonal IgG by rhizosecretion in hydroponic tobacco cultures. *Plant Biotechnology Journal* 14, 615–624. <https://doi.org/10.1111/PBI.12407>
- Madeira, L.M., Szeto, T.H., Ma, J.K.C., Drake, P.M.W., 2016b. Rhizosecretion improves the production of Cyanovirin-N in *Nicotiana tabacum* through simplified downstream processing. *Biotechnology Journal* 11, 910–919. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201500371>
- Majer, E., Llorente, B., Rodríguez-Concepción, M., Daròs, J.A., 2017. Rewiring carotenoid biosynthesis in plants using a viral vector. *Scientific Reports* 2017 7:1 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep41645>
- Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., Gleba, Y., 2004. In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 6852–6857. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0400149101>
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., Gleba, Y., 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology* 2005 23:6 23, 718–723. <https://doi.org/10.1038/nbt1094>
- Martí, M., Diretto, G., Aragonés, V., Frusciante, S., Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L., Daròs, J.A., 2020. Efficient production of saffron crocins and picrocrocin in *Nicotiana benthamiana* using a virus-driven system. *Metabolic Engineering* 61, 238–250. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2020.06.009>
- McGarry, R.C., Klocko, A.L., Pang, M., Strauss, S.H., Ayre, B.G., 2017. Virus-Induced Flowering: An Application of Reproductive Biology to Benefit Plant Research and Breeding. *Plant Physiology* 173, 47–55. <https://doi.org/10.1104/PP.16.01336>
- Merlin, M., Gecchele, E., Capaldi, S., Pezzotti, M., Avesani, L., 2014. Comparative evaluation of recombinant protein production in different biofactories: The green perspective. *BioMed Research International* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/136419>
- O'Rourke, J.P., Peabody, D.S., Chackerian, B., 2015. Affinity selection of epitope-based vaccines using a bacteriophage virus-like particle platform. *Current Opinion in Virology* 11, 76–82. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2015.03.005>
- Pastori, C., Tudor, D., Diomede, L., Drillet, A.S., Jegerlehner, A., Röhn, T.A., Bomsel, M., Lopalco, L., 2012. Virus like particle based strategy to elicit HIV-protective antibodies to the alpha-helic regions of gp41. *Virology* 431, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2012.05.005>

- Pushko, P., Tretyakova, I., Hidajat, R., Zsak, A., Chrzastek, K., Tumpey, T.M., Kapczynski, D.R., 2017. Virus-like particles displaying H5, H7, H9 hemagglutinins and N1 neuraminidase elicit protective immunity to heterologous avian influenza viruses in chickens. *Virology* 501, 176–182. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2016.12.001>
- Qiu, X., Wong, G., Audet, J., Bello, A., Fernando, L., Alimonti, J.B., Fausther-Bovendo, H., Wei, H., Aviles, J., Hiatt, E., Johnson, A., Morton, J., Swope, K., Bohorov, O., Bohorova, N., Goodman, C., Kim, D., Pauly, M.H., Velasco, J., Pettitt, J., Olinger, G.G., Whaley, K., Xu, B., Strong, J.E., Zeitlin, L., Kobinger, G.P., 2014. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* 2014 514:7520 514, 47–53. <https://doi.org/10.1038/nature13777>
- Revers, F., García, J.A., 2015. Molecular Biology of Potyviruses. *Advances in Virus Research* 92, 101–199. <https://doi.org/10.1016/BS.AIVIR.2014.11.006>
- Röder, J., Dickmeis, C., Commandeur, U., 2019. Small, smaller, nano: New applications for potato virus X in nanotechnology. *Frontiers in Plant Science* 10, 158. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00158/BIBTEX>
- Röder, J., Dickmeis, C., Fischer, R., Commandeur, U., 2018. Systemic infection of nicotiana benthamiana with Potato virus X nanoparticles presenting a fluorescent iLOV polypeptide fused directly to the coat protein. *BioMed Research International* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9328671>
- Röder, J., Fischer, R., Commandeur, U., 2017a. Adoption of the 2A Ribosomal skip principle to tobacco mosaic virus for peptide display. *Frontiers in Plant Science* 8, 1125. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.01125/BIBTEX>
- Röder, Juliane, Fischer, Rainer, Commandeur, Ulrich, Röder, J., Fischer, R., Commandeur, U., 2017b. Engineering Potato Virus X Particles for a Covalent Protein Based Attachment of Enzymes. *Small* 13, 1702151. <https://doi.org/10.1002/SMLL.201702151>
- Ryan, M.D., Drew, J., 1994. Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO Journal* 13, 928–933. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1994.TB06337.X>
- Sack, M., Rademacher, T., Spiegel, H., Boes, A., Hellwig, S., Drossard, J., Stoger, E., Fischer, R., 2015. From gene to harvest: insights into upstream process development for the GMP production of a monoclonal antibody in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnology Journal* 13, 1094–1105. <https://doi.org/10.1111/PBI.12438>
- Schaad, M.C., Lellis, A.D., Carrington, J.C., 1997. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *Journal of Virology* 71, 8624–8631. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.11.8624-8631.1997>
- Schähs, M., Strasser, R., Stadlmann, J., Kunert, R., Rademacher, T., Steinkellner, H., 2007. Production of a monoclonal antibody in plants with a humanized N-glycosylation pattern. *Plant Biotechnology Journal* 5, 657–663. <https://doi.org/10.1111/J.1467-7652.2007.00273.X>
- Shoji, Y., Farrance, C.E., Bautista, J., Bi, H., Musiyuchuk, K., Horsey, A., Park, H., Jaje, J., Green, B.J., Shamloul, M., Sharma, S., Chichester, J.A., Mett, V., Yusibov, V., 2012. A plant-based system for rapid production of influenza vaccine antigens. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 6, 204–210. <https://doi.org/10.1111/J.1750-2659.2011.00295.X>
- Shukla, S., Dickmeis, C., Fischer, R., Commandeur, U., Steinmetz, N.F., 2018. In Planta Production of Fluorescent Filamentous Plant Virus-Based Nanoparticles. *Methods in Molecular Biology* 1776, 61–84. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7808-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7808-3_5)
- Shukla, S., Dickmeis, C., Nagarajan, A.S., Fischer, R., Commandeur, U., Steinmetz, N.F., 2014. Molecular farming of fluorescent virus-based nanoparticles for optical imaging in plants, human cells and mouse models. *Biomaterials Science* 2, 784–797. <https://doi.org/10.1039/C3BM60277J>
- Sriraman, R., Bardor, M., Sack, M., Vaquero, C., Faye, L., Fischer, R., Finfern, R., 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 Biotechnology Journal* 2, 279–287. <https://doi.org/10.1111/J.1467-7652.2004.00078.X>
- Storni, T., Ruedl, C., Schwarz, K., Schwendener, R.A., Renner, W.A., Bachmann, M.F., 2004. Nonmethylated CG Motifs Packaged into Virus-Like Particles Induce Protective Cytotoxic T Cell Responses in the Absence of Systemic Side Effects. *The Journal of Immunology* 172, 1777–1785. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.172.3.1777>
- Strasser, R., 2016. Plant protein glycosylation. *Glycobiology* 26, 926–939. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWW023>
- Thomas, H., Sadras, V.O., 2001. The Capture and Gratuitous Disposal of Resources, Source: *Functional Ecology*.
- Tinazzi, E., Merlin, M., Bason, C., Beri, R., Zampieri, R., Lico, C., Bartoloni, E., Puccetti, A., Lunardi, C., Pezzotti, M., Avesani, L., 2015. Plant-derived chimeric virus particles for the diagnosis of primary sjögren syndrome. *Frontiers in Plant Science* 6, 1080. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2015.01080/BIBTEX>
- Twyman, R.M., Stoger, E., Christou, P., 2003. GENETIC MODIFICATION, APPLICATIONS | *Molecular Farming*. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* 436–442. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227050-9/00201-5>
- Ueda, M., Yamate, M., Du, A., Daidoji, T., Okuno, Y., Ikuta, K., Nakaya, T., 2008. Maturation efficiency of viral glycoproteins in the ER impacts the production of influenza A virus. *Virus Research* 136, 91–97. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2008.04.028>
- Uhde-Holzem, K., McBurney, M., Tiu, B.D.B., Advincula, R.C., Fischer, R., Commandeur, U., Steinmetz, N.F., 2016. Production of Immunoabsorbent Nanoparticles by Displaying Single-Domain Protein A on Potato Virus X. *Macromolecular Bioscience* 16, 231–241. <https://doi.org/10.1002/MABI.201500280>

- Uranga, M., Aragonés, V., Selma, S., Vázquez-Vilar, M., Orzáez, D., Daròs, J.A., 2021a. Efficient Cas9 multiplex editing using unspaced sgRNA arrays engineering in a Potato virus X vector. *The Plant Journal* 106, 555–565. <https://doi.org/10.1111/TPJ.15164>
- Uranga, M., Aragonés, V., Selma, S., Vázquez-Vilar, M., Orzáez, D., Daròs, J.A., 2021b. Efficient Cas9 multiplex editing using unspaced sgRNA arrays engineering in a Potato virus X vector. *Plant Journal* 106, 555–565. <https://doi.org/10.1111/tpj.15164>
- Uranga, M., Vazquez-Vilar, M., Orzáez, Di., Daròs, J.A., 2021c. CRISPR-Cas12a Genome Editing at the Whole-Plant Level Using Two Compatible RNA Virus Vectors. *CRISPR Journal* 4, 761–769. [https://doi.org/10.1089/CRISPR.2021.0049/SUPPL\\_FILE/SUPP\\_FIG5.PDF](https://doi.org/10.1089/CRISPR.2021.0049/SUPPL_FILE/SUPP_FIG5.PDF)
- Valleau, W.D., Johnson, E.M., 1928. Some virus diseases of tobacco in Kentucky [WWW Document]. *Phytopathology*. URL [https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as\\_sdt=0%2C5&q=Valleau%2C+W.+D.%2C+%26+Johnson%2C+E.+M.+%281928%29.+Some+virus+diseases+of+tobacco+in+Kentucky.+Phytopathology%2C+18%2C+132-133.&btnG=](https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Valleau%2C+W.+D.%2C+%26+Johnson%2C+E.+M.+%281928%29.+Some+virus+diseases+of+tobacco+in+Kentucky.+Phytopathology%2C+18%2C+132-133.&btnG=) (accessed 1.21.22).
- Venter, P.A., Dirksen, A., Thomas, D., Manchester, M., Dawson, P.E., Schneemann, A., 2011. Multivalent display of proteins on viral nanoparticles using molecular recognition and chemical ligation strategies. *Biomacromolecules* 12, 2293–2301. [https://doi.org/10.1021/BM200369E/SUPPL\\_FILE/BM200369E\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/BM200369E/SUPPL_FILE/BM200369E_SI_001.PDF)
- Wang, M., Gao, S., Zeng, W., Yang, Y., Ma, J., Wang, Y., 2020. Plant Virology Delivers Diverse Toolsets for Biotechnology. *Viruses* 2020, Vol. 12, Page 1338 12, 1338. <https://doi.org/10.3390/V12111338>
- Ward, B.J., Gobeil, P., Séguin, A., Atkins, J., Boulay, I., Charbonneau, P.Y., Couture, M., D’Aoust, M.A., Dhaliwall, J., Finkle, C., Hager, K., Mahmood, A., Makarkov, A., Cheng, M.P., Pillet, S., Schimke, P., St-Martin, S., Trépanier, S., Landry, N., 2021. Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. *Nature Medicine* 2021 27:6 27, 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01370-1>
- Zapata-Cuellar, L., Gaona-Bernal, J., Manuel-Cabrera, C.A., Martínez-Velázquez, M., Sánchez-Hernández, C., Elizondo-Quiroga, D., Camacho-Villegas, T.A., Gutiérrez-Ortega, A., 2021. Development of a Platform for Noncovalent Coupling of Full Antigens to Tobacco Etch Virus-Like Particles by Means of Coiled-Coil Oligomerization Motifs. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 4436 26, 4436. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26154436>
- Zhang, Y., Dong, Y., Zhou, J., Li, X., Wang, F., 2018. Application of Plant Viruses as a Biotemplate for Nanomaterial Fabrication. *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 2311 23, 2311. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23092311>
- Zischewski, J., Sack, M., Fischer, R., 2016. Overcoming low yields of plant-made antibodies by a protein engineering approach. *Biotechnology Journal* 11, 107–116. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201500255>

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Material Suplementario 1:** Cebadores empleados en este trabajo y su utilización en el mismo. En minúscula se representan los nucleótidos solapantes necesarios para el posterior ensamblaje Gibson.

Código de cebador	Secuencia (5'-3')	Objetivo
D4584	caggtacaATGGTGAGCAAGGGCGAG	Amplificación de GFP para introducción en plásmido intermedio
D4585	gtgccactCTTGTACAGCTCGTCCATG	
D4586	tgtacaagAGTGGCACTGTGGGTGCTG	
D4587	gctcaccaTGTACCTGACTGAAAATAAAGATTC	Amplificación plásmido intermedio para introducir GFP
D4584	caggtacaATGGTGAGCAAGGGCGAG	Amplificación de GFP para introducción en plásmido intermedio con F2A
D4588	ccgcttccCTTGTACAGCTCGTCCATG	
D4589	gtacaagGGAAGCGGAGTGAAACAG	
D4587	gctcaccaTGTACCTGACTGAAAATAAAGATTC	Amplificación plásmido intermedio con F2A para introducir GFP
D4590	caggtacaATGGTTAGCAAAGGGCGAG	Amplificación de mCherry para introducción en plásmido intermedio
D4591	gtgccactCTTATACAGCTCATCCATGC	
D4592	ctgtataagAGTGGCACTGTGGGTGCTG	
D4593	tgctaaccatTGTACCTGACTGAAAATAAAGATTC	Amplificación plásmido intermedio para introducir mCherry
D4590	caggtacaATGGTTAGCAAAGGGCGAG	Amplificación de mCherry para introducción en plásmido intermedio con F2A
D4594	ccgcttccCTTATACAGCTCATCCATGC	
D4595	tgtataagGGAAGCGGAGTGAAACAG	
D4593	tgctaaccatTGTACCTGACTGAAAATAAAGATTC	Amplificación plásmido intermedio con F2A para introducir mCherry
D4101	gataattattcgcatgccTAAGGATTTCCCACCATTTCC	Pasar de plásmido intermedio a plásmido GTEV
D4102	ggaacgtcgaggccCCTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAG	
D4246	cagcaccagctagcatgGACTACAAGGACGACGATG	Amplificación de CP <sub>TEV</sub> para introducirlo en plásmido PVX
D4247	ggaacttaacaaaccctaTTGGCGCACACCCAAAAG	
D4852	agccggccATGGTTAGCAAAGGCGAG	Amplificación mCherry para introducirlo en intermedio con CP <sub>TEV</sub>
D4857	gtccctgaCTTATACAGCTCATCCATGC	
D4858	ctgtataagTCAGGGACAGTCGGAGC	Amplificación del plásmido intermedio con CP <sub>TEV</sub> para introducir mCherry
D4855	taaccatGGCCGGCTGGGCTTTG	
D4109	ggcatattcaaggccCCTACTCGGAAAGGTGATAG	Pasar de plásmido intermedio a plásmido PVX
D4110	ttccagtatacgaccTCGAGTGACAGCTGCATC	
D2231	CGACGCACTCCTTCTTCATAACCCAAGTCCGTTTC	Retrotranscripción de plásmidos GTEV para comprobar las secuencias fusionadas a la CP
D3599	CATCTGTGCATCAATGATCGAA	Amplificación del cDNA procedente del plásmido GTEV
D3600	GTGTGGCTCGAGCATTTGACAA	
D2265	CTCTTTAATTGCTGCTGC	Retrotranscripción de plásmidos PVX para comprobar las secuencias introducidas
D1775	GCCATTGCCGATCTCAAGCCAC	Amplificación del cDNA procedente del plásmido PVX
D2069	GCTACTATGGCACGGGCTGTAC	