

# Heterologous expression of circular RNAs in *Escherichia coli* for analyzing the ligation process of chloroplastic viroids and producing double-stranded RNAs with insecticidal activity

Beltrán Ortolá Navarro

## Resumen

Los viroides, con un genoma mínimo de RNA circular no codificante, monocatenario y altamente estructurado, parasitan componentes celulares de las plantas para replicarse autónomamente, establecer infecciones sistémicas y habitualmente causar enfermedades. Los de la familia *Ausunviroidae* se replican y acumulan en cloroplastos mediante un mecanismo de círculo rodante simétrico, en el que una RNA polimerasa cloroplástica produce concatémeros lineales de polaridad complementaria que son reducidos a intermedios monoméricos por la actividad de las ribozimas de cabeza de martillo (HHR) presentes en el concatémero. Los extremos 5'-hidroxilo y 2',3'-fosfodiéster cíclico generados son sustrato en la formación de un enlace intramolecular 5',3'-fosfodiéster catalizado por la isoforma cloroplástica de la tRNA ligasa, generando moléculas circulares de polaridad complementaria que pueden entrar otra ronda de transcripción, simétrica a la primera. En esta Tesis se han analizado las secuencias y estructuras viroidales esenciales para la circularización, empleando como modelo el viroide latente de berenjena (ELVd), que induce infecciones asintomáticas en berenjena (*Solanum melongena* L.). Para ello, expresamos en *Escherichia coli* precursores del ELVd (+) lineales flanqueados por dos copias de su HHR. Su procesamiento produce monómeros con los extremos

apropiados para la ligación mediada por la tRNA ligasa de la berenjena, que es coexpresada. Mutaciones puntuales y deleciones en el sitio nativo de ligación sugieren que solo el dominio HHR es esencial en el proceso de circularización. La aparente conservación entre la secuencia y estructura de las HHR con aquellas del sustrato natural del enzima (los tRNAs), nos llevan a proponer que la HHR del ELVd secuestra la ligasa mimetizando las características generales del bucle del anticodón de los tRNAs.

Este sistema de expresión se ha empleado también para producir RNAs recombinantes de interés, insertándolos en una posición particular del RNA del ELVd (+). Las moléculas quiméricas son procesadas por las HHR flanqueantes y sus extremos reconocidos y ligados por la tRNA ligasa. El andamiaje viroidal circular, compacto y posiblemente asociado a la ligasa, es responsable de aumentar la vida media del RNA de interés y su acumulación en la bacteria. En esta Tesis adaptamos este sistema para la producción de moléculas de RNAs de doble cadena (dsRNAs) capaces de desencadenar la respuesta de interferencia por RNA (RNAi), un mecanismo natural de defensa y regulación génica transcripcional y post-transcripcional en células eucariotas basado en la complementariedad de bases entre RNAs. dsRNAs complementarios a genes endógenos generan fenotipos de pérdida de función al afectar los niveles de transcritos celulares. Además, los insectos y otros organismos tienen capacidad de tomar estos dsRNAs del ambiente, internalizarlos en sus células y distribuirlos de manera sistémica, lo que hace al RNAi una estrategia prometedora para el control de plagas. Para la producción de los dsRNAs, separamos las repeticiones invertidas del gen diana que genera la horquilla dsRNA con el cDNA del intrón autocatalítico del grupo I del rRNA 26S de *Tetrahymena thermophila*, aumentando la estabilidad de los plásmidos de expresión. Tras la transcripción, el intrón

es eliminado de la molécula final, una molécula viroidal de la que protruye una horquilla con el dsRNA de interés. Además, incorporar una copia adicional del mismo intrón en forma permutada flanqueando las repeticiones invertidas permite separar la molécula del viroide del producto final, una molécula de dsRNA circular cerrada en ambos lados por pequeños bucles. Ambos tipos de moléculas poseen actividad reguladora: las quimeras viroide-dsRNA con homología al gen de la unión septada suave 1 del gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte; Coleoptera, Chrysomelidae) exhiben una actividad insecticida oral contra las larvas similar a la de horquillas sintetizadas *in vitro*, mientras que los dsRNAs circulares sin el andamiaje viroidal homólogos al gen de la subunidad A de la ATPasa vacuolar y la proteína ribosomal S13 silencian sus respectivos genes en adultos de la mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata* Wiedemann; Diptera, Tephritidae) con elevada eficiencia. El segundo caso es de especial relevancia al ser la primera demostración de la estrategia de RNAi para el control de esta devastadora plaga de los cultivos agrícolas.

En conclusión, el ELVd es, a pesar de su limitada relevancia agrícola, una plataforma muy útil para investigar la biología molecular de la familia *Ausunviroidae*, así como una poderosa herramienta biotecnológica cuando se usa en combinación con nuestro sistema de expresión de *E. coli*.