



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Instituto de Biología Molecular
y Celular de Plantas

**Contribución de los extremos amino y carboxilo
de la proteína de cubierta en la producción de
proteínas recombinantes a través de un vector
derivado del virus del mosaico del tabaco**

Cristina Beceiro Durán

Valencia, Enero de 2017

Dirigido por: Dr. José Antonio Darós Arnau

Alberto Tomás Carbonell Olivares

Universidad Politécnica de Valencia

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

RESUMEN

Los virus de plantas pueden ser manipulados y convertidos en herramientas biotecnológicas para la producción de proteínas recombinantes en plantas biofactoría. Entre los virus más utilizados como vectores destaca el virus del mosaico del tabaco (TMV), un virus de RNA de cadena positiva que infecta rápida y eficientemente plantas de la familia de las solanáceas y que, a los pocos días de la inoculación, produce enormes cantidades de su proteína de cubierta (CP). En muchos de los vectores desarrollados a partir del TMV se reemplaza la mayor parte de la región codificante de la CP viral por el cDNA que codifica la proteína recombinante de interés. Consecuentemente, el virus pierde su capacidad de movimiento sistémico, aunque no el de célula a célula. Sin embargo, en estos vectores se mantienen, flanqueando al cDNA de la proteína de interés, los extremos 5' y 3' de la región codificante de la CP aunque con modificaciones para que no se traduzcan. Estas regiones contienen elementos importantes para la correcta expresión de la proteína recombinante. En este trabajo nos hemos preguntado qué pasaría con el rendimiento de la proteína recombinante si estos fragmentos de secuencia sí que se tradujeran e incorporaran como fusiones amino y carboxilo terminales a la proteína de interés. Nuestros resultados muestran como la producción de la proteína fluorescente verde aumenta cuando se utiliza un vector derivado del TMV que provoca la fusión traduccional de estos extremos de la CP viral.

SUMMARY

Plant viruses can be manipulated and converted into biotechnological tools to produce recombinant proteins in biofactory plants. One of the viruses most frequently used is *Tobacco mosaic virus* (TMV), a plus-strand RNA virus that quickly and efficiently infects solanaceous plants and that, in a few days after inoculation, produces vast amounts of the viral coat protein (CP). In many TMV-based vectors, most of the CP coding region is replaced by the cDNA corresponding to the recombinant protein of interest. Consequently, the virus loses the capacity to move systemically, although keeps moving cell-to-cell. However, in these vectors the 5' and 3' termini of the CP coding region is maintained, flanking the cDNA of the protein of interest, although with modifications to avoid translation. These regions contain important elements for the correct expression of the recombinant protein. In this work, we wondered how the yield of the recombinant protein would be affected provided these fragments were translated and incorporated to the protein of interest as amino and carboxyl fusions. Our results show how the production of the green fluorescent protein increases when we use a TMV-derived vector that induces the translational fusion of these termini of the viral CP.

INTRODUCCIÓN

Las plantas como biofactoría

El concepto de *molecular pharming* o *farming* se refiere al empleo de la ingeniería genética para introducir en organismos biofactoría genes que permiten la producción de moléculas con interés farmacéutico o industrial. Los productos del *pharming* suelen ser las propias proteínas introducidas (proteínas recombinantes) o metabolitos relacionados con las mismas. En la actualidad, un gran porcentaje del *molecular pharming* utiliza como base organismos unicelulares como bacterias y levaduras o líneas celulares derivadas de mamíferos como las células CHO. Sin embargo, las plantas presentan una serie de características que han hecho que el interés en usarlas como biofactoría aumente en los últimos años (Paul and Ma, 2011). Algunas de las características favorables de las plantas como plataforma para producir proteínas recombinantes son (Desai *et al.*, 2010; Tuse *et al.*, 2014):

1. Facilidad de manejo y mantenimiento comparado con un biorreactor tradicional.
2. Producción de metabolitos libres de contaminación por patógenos animales y/o humanos.
3. Las plantas tienen la capacidad de sintetizar y procesar (ej. modificaciones postraduccionales como la glicosilación) proteínas complejas que en otros organismos modelo (como las levaduras) son muy costosas o actualmente imposibles de producir.
4. Potencial para producir proteínas recombinantes con alto rendimiento. La purificación también es sencilla y relativamente poco costosa.
5. Adicionalmente, la producción de la proteína recombinante se puede concentrar en un tejido o tipo celular concreto (raíces, tubérculos, frutos, exudados) que simplifique aún más el proceso de purificación. La acumulación en estructuras

concretas también puede explotarse como método de almacenamiento (conservación sin necesitar cadena de frío) o incluso de consumo (vacunas orales).

6. Posibilidad de escalar la producción de manera sencilla y con poca inversión en infraestructura.

A pesar de todas estas ventajas, el principal inconveniente que presentan las plantas modificadas genéticamente para producir proteínas recombinantes es un rendimiento insuficiente para competir con el resto de sistemas ya aceptados por la industria. Uno de los principales focos de investigación se centra en tratar de subsanar este problema y se han propuesto varias alternativas. El uso de determinados elementos genéticos en combinación con el transgén de interés ha conseguido mejorar el rendimiento de la expresión en algunos tejidos (raíces y hojas) de líneas transgénicas, pero resulta aún más interesante el uso de plantas no transgénicas en las que se pueden conseguir picos de producción mediante la expresión transitoria (Paul and Ma, 2011).

Vectores virales y expresión transitoria.

La expresión transitoria se define como el conjunto de técnicas que permiten la introducción y expresión de material genético en una célula sin que el mismo se incorpore al genoma, es decir, que no derive en una transformación genética estable. El desarrollo de una línea transgénica, particularmente en plantas, es un proceso costoso y dilatado en el tiempo, y que con frecuencia presenta problemas de rendimiento en la producción de proteínas recombinantes. La expresión transitoria se vale de elementos como virus y bacterias (como *Agrobacterium tumefaciens*) para introducir el material genético en la planta. La potencia de estas herramientas reside en que su estructura más sencilla las hace más fáciles de manipular y editar que el genoma complejo de una planta. En el caso de muchos virus, la replicación en el citoplasma favorece una expresión rápida que deriva en acumulación del producto recombinante y no en información heredable, lo cual es una ventaja en términos de bioseguridad (Valero, 2016).

Los vectores virales se pueden clasificar en dos categorías. Los vectores de primera generación que siguen una “estrategia de virus completo” consisten en virus funcionales que expresan de manera adicional una proteína recombinante asociada a algún tipo de promotor fuerte. Algunas de las ventajas de contar con un virus completo son la capacidad de movimiento sistémico, es decir, que la infección y con ella la expresión de la proteína recombinante se extienda por toda la planta, y que es muy fácil de inocular a gran escala. A pesar de eso, la tasa de infección tiende a ser baja y es frecuente encontrarse con fuertes restricciones de tamaño para el material recombinante si no queremos interferir con la estructura del virión, la cual suele jugar un papel clave en la capacidad de movimiento del virus. Estas construcciones tienden a ser inestables y a progresar de manera errática, lo que dificulta mucho escoger el momento de recolección (Gleba *et al.*, 2007).

Los vectores de segunda generación surgen como respuesta a los inconvenientes de los vectores de primera generación, y se centran en implementar en *A. tumefaciens* sólo aquellas partes de la maquinaria viral que resultan beneficiosas en los procesos de expresión de la proteína recombinante. Por ejemplo, es común la delección de la proteína de cubierta (CP) para evitar el gasto metabólico que supone sintetizarla en grandes cantidades. Esto tiene como contrapartida que la capacidad de movimiento sistémico se suele perder, aunque una compensación sencilla es el infectar una mayor superficie de la planta para poder aprovechar el movimiento local (célula a célula). Las principales limitaciones de este sistema van asociadas a la relativamente baja tasa de éxito que tiene la infección por *A. tumefaciens* y a que sigue siendo un sistema susceptible a los mecanismos de silenciamiento génico, que suelen provocar una pérdida rápida de productividad (Gleba *et al.*, 2007).

Vectores de expresión derivados del virus del mosaico del tabaco (TMV)

El TMV es un virus de RNA monocatenario de cadena positiva sobre el que se han diseñado multitud de vectores de expresión transitoria debido a que las plantas infectadas acumulan enormes cantidades de la CP viral (Shivprasad *et al.*, 1999). El grupo de Lindbo desarrolló, a partir de un clon infeccioso del TMV, un vector denominado TRBO (*TMV RNA-based overexpression vector*) capaz de producir grandes cantidades de una serie de proteínas recombinantes (Lindbo, 2007). Este

vector se caracterizaba por el reemplazo de la mayor parte del cDNA de la CP por el cDNA de la proteína recombinante, con lo que se acercó el sitio de inserción del gen recombinante al extremo 3' viral, lo cual tuvo un efecto positivo en la expresión del inserto. En este vector, así como en la mayoría de los que le siguieron, incluyendo los de segunda generación (Giritch *et al.*, 2006; Gleba *et al.*, 2014), se mantuvieron los extremos 5' y 3' de la región codificante de la CP del TMV flanqueando el cDNA de la proteína de interés. Estas regiones contienen elementos importantes para la correcta expresión del gen de interés. En la región 5' se mutó el codón de inicio (ATG) a AGA para impedir que la traducción comenzara en este fragmento de secuencia viral. Mientras que por delante del extremo 3' se insertó un codón de parada para, de nuevo, no incorporar este fragmento de secuencia del TMV en la proteína recombinante (Lindbo, 2007).

OBJETIVOS

En la mayoría de vectores derivados del virus mosaico del tabaco (TMV) se reemplaza la secuencia codificante de su proteína de cubierta (CP) por el cDNA que codifica la proteína recombinante de interés. Sin embargo, en el vector se mantienen los fragmentos 5' y 3' de la región codificante de la CP, aunque no se expresan. Para ello se suele mutar el codón de inicio de la CP y se inserta un codón de parada al final del cDNA de la proteína recombinante. Nosotros nos hemos preguntado el efecto de estos fragmentos cuando se incorporan a las proteínas recombinantes en vectores derivados del TMV, por lo que los objetivos a cumplir en este trabajo han sido los siguientes:

1. Evaluar el papel de los extremos amino y carboxilo terminales de la CP del TMV en los niveles de expresión de proteínas recombinantes utilizando un vector viral derivado de este virus que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) de *Aquaerea victoria*.
2. Analizar el potencial de dicho vector viral para producir proteínas recombinantes, tales como las implicadas en la producción de metabolitos de interés nutricional como las antocianinas y carotenoides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la PCR se utilizó la DNA polimerasa Phusion de Thermo Scientific debido a su gran fidelidad de copia. La concentración final de los cebadores (Tabla 1) fue de 0,5 μ M, y el programa general del termociclador constó de una desnaturalización inicial (30 s, 98°C), 30 ciclos (10 s a 98°C + 30 s 55°C + 30 s 72°C) y una elongación final de 10 min a 72°C. Adicionalmente, en algunas ocasiones el DNA molde se eliminó con un tratamiento con DpnI (10 U, 1 h a 37°C).

Electroforesis

Para las separaciones electroforéticas se utilizaron geles de agarosa al 1% en tampón TAE. Los minigeles (8x6,5x0,5 cm) se corrieron durante 75 min a 60 V, mientras que los geles de tamaño medio (15x11x0,5 cm) requirieron 75 min a 90 V para una correcta separación del DNA. Las muestras se cargaron con ayuda de un tampón de carga rico en glicerol y teñido con azul de bromofenol. Los geles se tiñeron durante 15 min con una solución de bromuro de etidio y se fotografían en un sistema de fotodocumentación UVIDoc de UVITEC.

Purificación de ácidos nucleicos

Los productos de PCR, digestión con endonucleasas y de ligación se purificaron con el kit DNA Clean&Concentrator-5 de Zymo Research, de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante.

Transformación de *Escherichia coli* por electroporación

Se utilizaron 40 μ l de *E. coli* DH5 α electrocompetentes en cada evento de transformación con cantidades variables de plásmido dependiendo de su concentración (0,2-1 μ l). La electroporación se llevó a cabo en cubetas de 0.1 cm

con un equipo BTX ECM399 a 1500 V durante 5 ms. Las células se resuspendieron en medio SOC y se incubaron 1 h antes de plaquear.

Siembra y cultivo microbiológico

Los cultivos de *E. coli* se cultivaron sobre placas de medio LB-agar con el antibiótico adecuado según el plásmido (kanamicina, ampicilina...) y se incubaron durante 24 h a 37°C o 48 h a 28°C. Para el cultivo de colonias aisladas se utilizaron de 3 a 10 ml de medio LB líquido (con el antibiótico correspondiente) en tubos de ensayo con rosca, con los mismos tiempos de incubación.

Purificación de plásmidos de DNA

Para purificar plásmidos a partir de un cultivo bacteriano líquido se empleó el kit GeneJet Plasmid Miniprep de Thermo Scientific, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. También se recurrió a extracciones basadas en fenol:cloroformo, en aquellos casos donde se requería analizar gran cantidad de muestras.

Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de las muestras de ácidos nucleicos se hizo por espectrofotometría, mediante un equipo Nanodrop ND-1000 de Thermo Scientific.

Digestión de DNA con enzimas de restricción

A lo largo del proyecto se utilizaron una variedad de enzimas de restricción, principalmente de Thermo Scientific y EURx. El protocolo estándar de digestión fue de 1 h en termobloque a 37°C con el tampón adecuado para cada enzima o combinación de enzimas.

Ensamblaje Gibson

Para ensamblar fragmentos de DNAs se empleó el NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix de New England Biolabs. La mezcla de reactivos se incubó en a 50°C durante 1 h (Gibson *et al.*, 2009).

Ligación de DNA

Para ligar moléculas de DNA se utilizaron 5 U de la T4 DNA ligasa de Thermo Fisher Scientific. La mezcla de DNAs se incubó 5 min a 55°C antes de añadir la ligasa. A continuación, la mezcla se incubó 1 h a 22°C.

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación

Para transformar la cepa C58C1 de *A. tumefaciens*, que contenía el plásmido auxiliar pCLEAN-S48 (Thole *et al.*, 2007), se utilizaron alícuotas de 40 µl de células electrocompetentes en cada evento de transformación, con cantidades variables de plásmido dependiendo de su concentración (en general 1 µl). La electroporación se llevó a cabo como se ha indicado más arriba para *E. coli* con la salvedad que el cultivo se incubó 2 h a 28°C antes de plaquear. Las bacterias se plaquearon en medio LB sólido incluyendo rifampicina, tetraciclina y kanamicina.

Preparación de inóculo para agroinfiltración

A partir de un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con el plásmido de interés en medio LB líquido con kanamicina, se centrifugó (10.000 rpm, 15°C, 15 min) el volumen de cultivo necesario para poder obtener el volumen deseado de inóculo a densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,5. Las células se resuspendieron en medio MES con acetosiringona a 150 µM y se incubaron 2 h a 28°C para favorecer la inducción de los genes de virulencia de la bacteria. En algunos experimentos se realizaron diluciones seriadas del inóculo en medio MES-acetosiringona antes de la infiltración para analizar el efecto de la DO sobre el tejido vegetal.

Conservación de microorganismos en glicerol

Una parte de los cultivos bacterianos se reservó para experimentos posteriores en presencia de glicerol. Para ello se realizó una mezcla 1:1 en volumen de cultivo y glicerol al 20%. A continuación, los cultivos se almacenaron a -80°C por un tiempo prolongado.

Extracción de GFP y medida de la fluorescencia verde

Las muestras de planta congeladas o conservadas en nitrógeno se homogenizaron individualmente con un homogenizador de mano TissueRuptor (Qiagen) en 10 volúmenes de tampón carbonato sódico pH 9,6. Una alícuota del homogenizado se centrifugó (13.000 rpm, 5 min) y se tomaron 200 µl del sobrenadante que se cargaron en placas Greiner de 96 pocillos. En ocasiones este sobrenadante se almacenó a -80°C para su posterior análisis. La fluorescencia verde se determinó con un fluorímetro de placas Victor de Perkin Elmer de acuerdo con los parámetros de la Fig. 1.

```
Name of the label ..... DarosGFP
Label technology ..... Prompt fluorometry
CW-lamp filter name ..... F485
CW-lamp filter slot ..... A5
Emission filter name ..... F510-10
Emission filter slot ..... A2
Measurement time ..... 0.2 s
Emission aperture ..... Normal
CW-lamp energy ..... 30000
Second measurement CW-lamp energy . 0
Emission side ..... Below
CW-Lamp Control ..... Stabilized Energy
Excitation Aperture ..... Normal
```

Figura 1: Parámetros y condiciones para la medida de la fluorescencia de la GFP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Construcción de una serie de vectores TMV-GFP con extensiones amino y carboxilo terminales en la GFP correspondientes a los extremos de la CP del TMV

Los cDNAs correspondientes a la GFP (Baulcombe *et al.*, 1995), los amplificamos a partir del plásmido p15TV3-TSTGFP, el cual sirvió de molde para dos reacciones distintas de PCR. En ellas se utilizaron dos parejas diferentes de cebadores para obtener dos versiones del inserto (Tabla 1). La primera pareja (D1756-D1757) respeta los codones de inicio y parada originales de la proteína; mientras que la otra (D1756-1758) añade una extensión C-terminal a la GFP. Para separar el DNA amplificado se corrieron los productos de PCR en un gel, se cortó la banda y se eluyó el DNA (Fig. 2).

Tabla 1: Cebadores utilizados durante la construcción de los plásmidos TMV-GFP

Nombre	Secuencia en negrita (en gris se indica la secuencia de la cadena complementaria)	Uso
D1756	5' -agttcgtggttcttgtca ATGGT GAGCAAGGGCGAG-3' 3' -tcaagcacaagaacagt TACCACT CGTTCCCGCTC-5'	Cebador directo en amplificación GFP
D1757	5' -GCATGGACGAGCTGTACAAGggtcctgcaacttgag-3' 3' -CGTACCTGCTCGACATG TTC ccaggacggtgaactc-5'	Cebador reverso en amplificación GFP (añade extensión C-terminal)
D1758	5' -CATGGACGAGCTGTACAAG TGA ggtcctgcaacttgag-3' 3' -GTACCTGCTCGACATG TTC ACTccaggacggtgaactc-5'	Cebador reverso en amplificación GFP (codón de parada)
D1755	5' -CTCGAGGTCCTGCAACT TGA GGTAGT-3' 3' -GAGCTCCAGGACGTT GAACT CCATCA-5'	Cebador usado en conversión GFP-C → GFP-0

En paralelo a la preparación del inserto, amplificamos en *E. coli* dos versiones de un plásmido que sirvió de paso intermedio en la construcción de los vectores (Fig. 3). La versión pTTMVΔCP3Z aporta una extensión N-terminal a la proteína recombinante, mientras que la pTTMVΔCP3Z-AGA no añade secuencias adicionales a la proteína recombinante por tener mutado el codón de inicio de la CP de ATG a AGA. Una vez purificados los plásmidos se procedió a la digestión enzimática de los

mismos (AgeI-XhoI) para la sustitución de la mayor parte del cDNA de la CP del TMV por el cDNA de la GFP mediante ensamblaje Gibson (Gibson *et al.*, 2009). Los productos de los diferentes ensamblajes se purificaron, electroporaron y se analizaron (por electroforesis y digestión analítica) con el fin de seleccionar un plásmido candidato de cada una de las cuatro combinaciones.

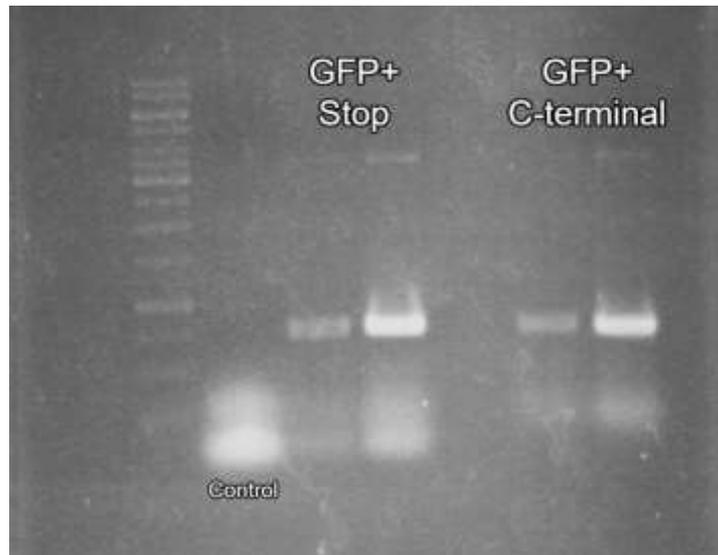


Figura 2: Electroforesis con los productos de PCR obtenidos a partir de p15TV3-TSTGFP.



Figura 3: Electroforesis de los plásmidos de partida utilizados para la construcción de los distintos vectores TMV-GFP.

El segundo paso en la elaboración de las construcciones conllevó la incorporación de los ensamblados intermedios en el plásmido de destino que contiene el cDNA completo del TMV, llamado pGTMV (Fig. 3). El ensamblaje entre pGTMV y las construcciones intermedias se llevó a cabo por digestión de ambos plásmidos con enzimas únicos (NcoI-Pfl23II) y ligación con T4 DNA ligasa. La selección de los clones exitosos se llevó a cabo, de nuevo, por análisis electroforético y digestiones analíticas con endonucleasas de restricción. Los plásmidos se confirmaron por secuenciación. Los cuatro plásmidos TMV-GFP resultantes se detallan en la Tabla 2, en la que se explica qué plásmido incorpora la extensión N de la CP del TMV, la C, las dos o ninguna en la secuencia codificante de la GFP.

Tabla 2: Esquematización de las cuatro construcciones TMV-GFP

Nombre	Cebador reverso	Plásmido intermedio	Extensión N-terminal	Extensión C-terminal
TMV-GFP-NC	D1757	pTTMVΔCP3Z	Sí	Sí
TMV-GFP-N	D1758	pTTMVΔCP3Z	Sí	No
TMV-GFP-C	D1757	pTTMVΔCP3Z-AGA	No	Sí
TMV-GFP-0	D1758	pTTMVΔCP3Z-AGA	No	No

Análisis del nivel de expresión de GFP en los vectores virales derivado del TMV en los que la proteína recombinante contiene extensiones correspondientes a los extremos de la CP viral

Una vez completada la construcción de los vectores en sus distintas versiones, transferimos los plásmidos a *A. tumefaciens* (cepa C58C1) para proceder a observar los efectos *in planta* mediante un ensayo de expresión transitoria. El material vegetal utilizado en los distintos experimentos fueron plantas de *Nicotiana benthamiana* de entre 4 y 5 semanas. Dependiendo del tamaño y edad de la planta se seleccionaron dos hojas verdaderas (entre la 5 y la 7) para la agroinfiltración, generalmente de dos halos por hoja.

En primer lugar, realizamos un análisis comparativo de las cuatro construcciones, enfrentadas a un control sin inocular y al tampón de extracción de la GFP como blanco para desestimar cualquier valor de fondo en la medida de fluorescencia (Fig. 4).

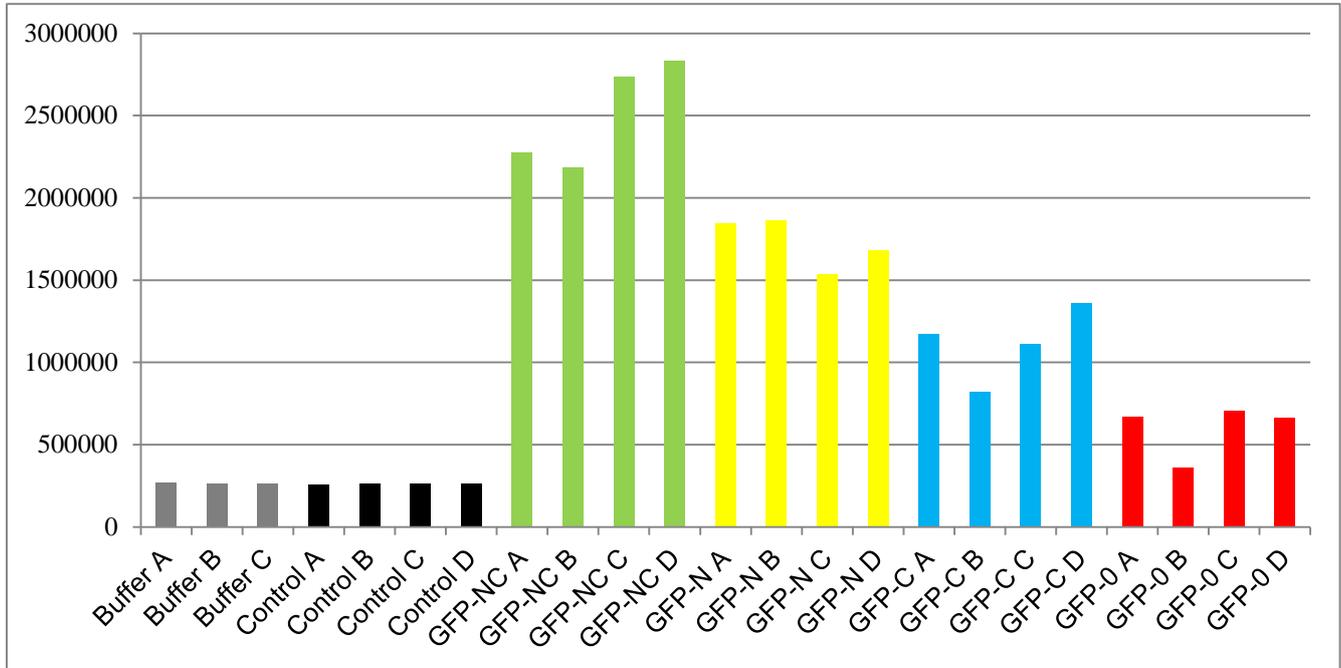


Figura 4: Comparativa de emisión de fluorescencia verde (unidades arbitrarias) de las cuatro construcciones de TMV-GFP (7 días post inoculación). A, B, C y D corresponden a muestras independientes.

El gráfico de la Fig. 4 nos permite ver cómo las extensiones de la proteína de cubierta nativa del virus ayudan a mejorar los niveles de expresión de la proteína recombinante en el vector viral. La extensión N-terminal parece tener mayor efecto que C-terminal, y la presencia de las dos (TMV-GFP-NC) parece tener un efecto aditivo.

En paralelo a la realización de la comparativa, se planteó la cuestión de conocer la dinámica de expresión del vector viral una vez infecta la planta, por lo que también se recogieron muestras cronológicamente (*time course*) desde el momento de la infiltración hasta 14 días después de la agroinfección. Este análisis se realizó con la construcción TMV-GFP-NC. El *time course* nos da información de cómo progresa la infección en la planta (Fig. 5). En un principio (2 días post inoculación, DPI) no hay

acumulación de GFP, o es tan pequeña que no tiene un efecto discernible del aspecto de las plantas control. A lo largo de los días la proteína comienza a acumularse y observamos que las medidas de fluorescencia más intensas se concentran en los días 6 y 8. A partir del día 8 los niveles de GFP descienden y desde el día 10 en adelante no superan los datos del día 4.

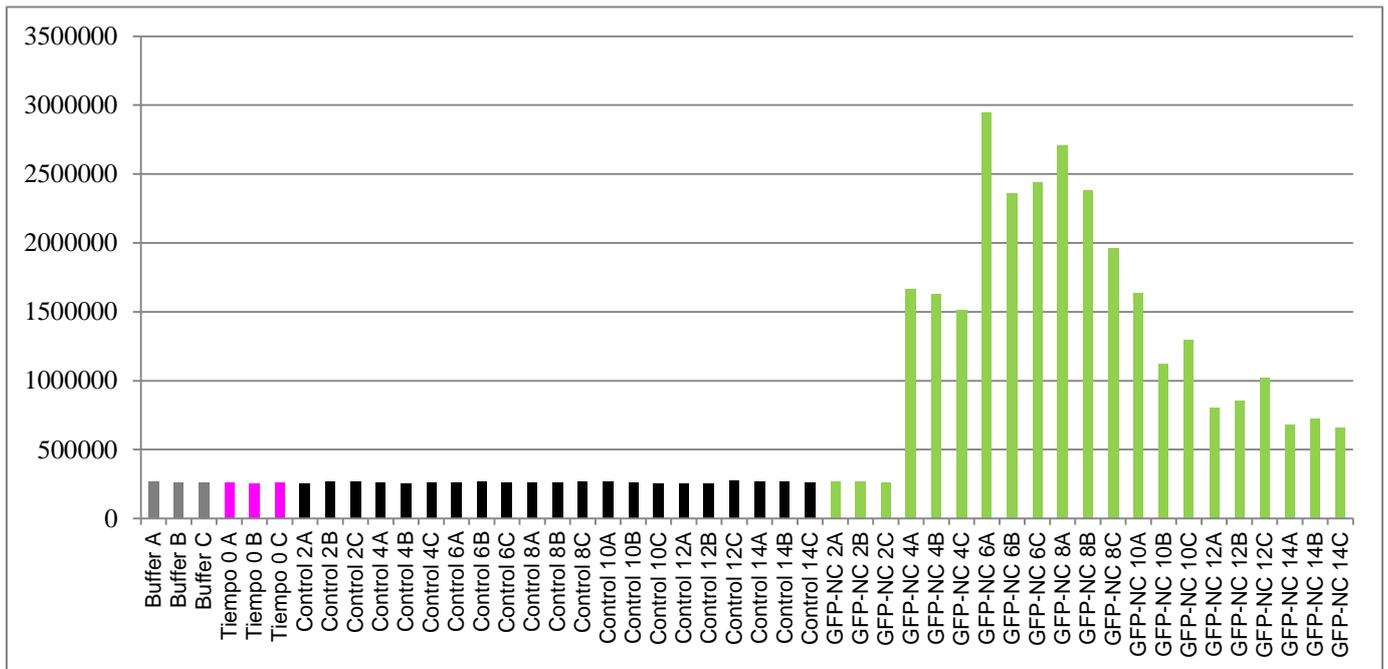


Figura 5: Dinámica de la expresión de GFP con el vector TMV-GFP-NC (0-14 días posinoculación). A, B, C y D corresponden a muestras independientes.

Es de destacar el efecto positivo que las extensiones C-terminal y sobre todo N-terminal parecen tener sobre la acumulación de GFP en la planta. En el caso de la versión GFP-NC las medidas de fluorescencia casi triplican las de la versión GFP-0, por lo que decidimos comparar el rendimiento de nuestro vector experimental con el de un sistema disponible a nivel comercial, también derivado del TMV. A través del laboratorio 2.10 del IBMCP (Dr. Diego Orzáez) conseguimos una cepa de *A. tumefaciens* C58C1 que contiene un vector de expresión de GFP de Icon Genetics (Gleba *et al.*, 2007). Para este experimento decidimos centrarnos exclusivamente en las versiones GFP-NC y GFP-N debido a que son las dos versiones que proporcionaron los mejores resultados en ensayos anteriores.

Los resultados de la Fig. 6 muestran que la producción de GFP parece ser superior en nuestras construcciones que con el sistema de Icon Genetics. Esta mayor producción podría deberse al efecto favorecedor de incluir las extensiones N y C-terminales de la proteína de cubierta del TMV en la proteína recombinante que se quiere producir. La Fig. 7 muestra fotos de lupa de fluorescencia de los tejidos infectados con TMV-GFP-NC.

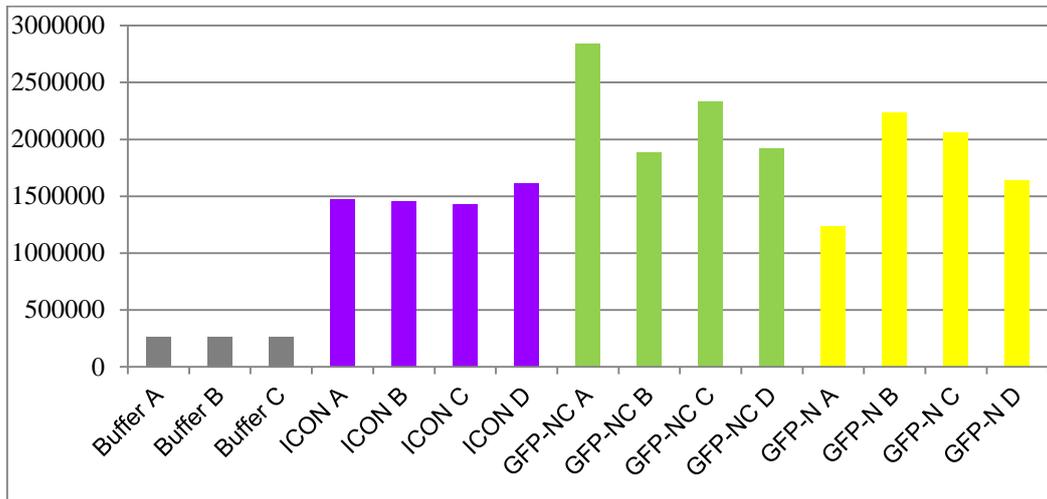


Figura 6: Comparativa de expresión de los vectores experimentales TMV-GFP desarrollados en este trabajo frente al vector de Icon Genetics también derivado del TMV (7 DPI).

A, B, C y D son muestras independientes.

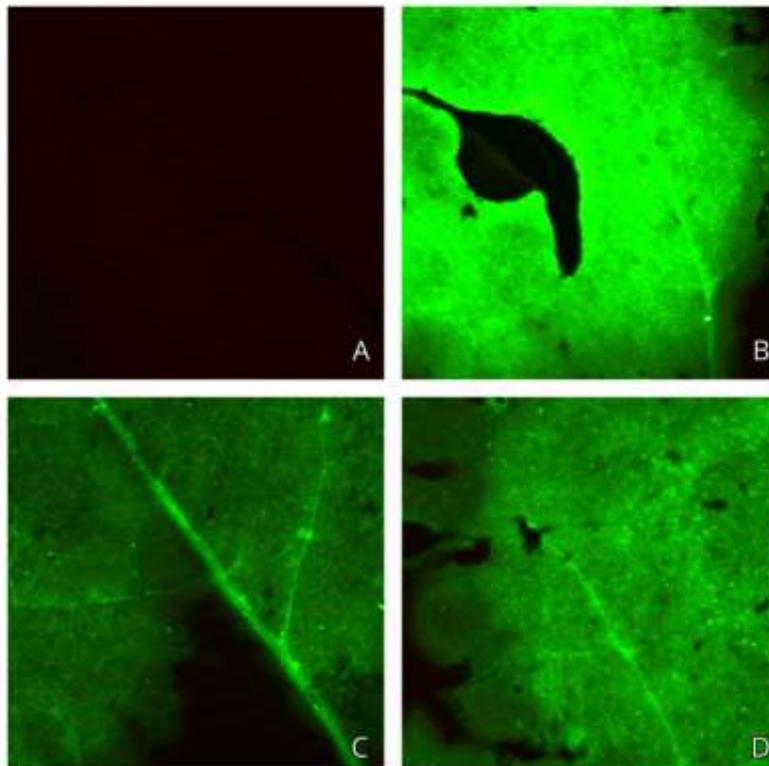


Figura 7: Fotografías tomadas a muestras de hoja expuestas a luz ultravioleta con una lupa de

fluorescencia. **A:** Hoja control a 7 DPI. Se observa un fondo rojo tenue por autofluorescencia de la clorofila. **B, C y D:** Hojas infectadas con TMV-GFP-N, -C y -NC, respectivamente, a 7 DPI.

Durante el desarrollo de vectores de expresión en plantas derivados del TMV se han mantenido los extremos 5' y 3' de la región codificante de la CP en los vectores por su efecto en el nivel de expresión (Lindbo, 2007). Sin embargo, estas regiones no se traducen e incorporan en la proteína recombinante. Nuestros datos experimentales indican que la traducción de estas regiones e incorporación a la proteína recombinante tiene un efecto beneficioso sobre el nivel de expresión. En muchos proyectos, sin embargo, cuando se quiere producir una proteína con una secuencia concreta (por ejemplo proteínas terapéuticas) se preferirá sacrificar producción para obtener la secuencia deseada. En otros, sin embargo, en los que se quiere producir enzimas industriales o enzimas y factores de transcripción que inducen la producción de metabolitos en la planta, la presencia de estas extensiones no implican ninguna limitación y su incorporación podría aumentar el nivel de expresión y actividad.

Expresión de Rosea1 y crtB mediante el vector viral derivado del TMV

Tras observar los resultados prometedores de las construcciones TMV-GFP, nos planteamos la posibilidad de utilizar este vector para redirigir la producción de metabolitos en las plantas. Para explorar esta opción escogimos dos proteínas, el factor de transcripción Rosea1 de *Antirrhinum majus* y la fitoeno sintasa (crtB) de *Pantoea ananatis*, que inducen la acumulación de antocianinas (Bedoya *et al.*, 2012; Majer *et al.*, 2013) y carotenoides (Majer *et al.*, 2016), respectivamente. De manera similar a la primera parte del proyecto, utilizamos dos parejas de cebadores diferentes para amplificar dos versiones de nuestros insertos, una con el codón de parada original y otra con una extensión C-terminal (Tabla 3). Rosea1 se amplificó a partir del plásmido pGRos1 y crtB a partir de pACCRTB-EIB (Fig. 8).

Tabla 3: Cebadores utilizados en la amplificación de los cDNAs de Rosea1 y crtB.

Nombre	Secuencia en negrita (en gris la secuencia complementaria)	Uso
D2348	5' -tccatctcagttcgtggttcttctgtca ATG GAAAAGAATTGTCGTG-3' 3' -aggtagagtcaagcacaagaacagtTACCTTTTCTTAAACAGCAC-5'	Cebador directo en amplificación Ros1
D2349	5' -CCCAACAAAT TGG AAAT TAA ggtcctgcaacttgaggtagtcaag-3' 3' -GGGTTGTTTAACTTTAATTccaggacggtgaactccatcagttc-5'	Cebador reverso amplificación Ros1 (codón de parada)
D2405	5' -AGGCCCAACAAAT TGG AAATggtcctgcaact tga ggtagtcaag-3' 3' -TCCGGGTTGTTTAACTTTAccaggacggtgaactccatcagttc-5'	Cebador reverso amplificación Ros1 (añade extensión C-terminal)
D2350	5' -tccatctcagttcgtggttcttctgtca ATG AATAATCCGTCGTTACTCAATC-3' 3' -aggtagagtcaagcacaagaacagtTACTTATTAGGCAGCAATGAGTTAG-5'	Cebador directo amplificación crtB
D2351	5' -TGGCAGCGCCCGCTC TAG ggtcctgcaacttgaggtagtcaag-3' 3' -ACCGTCGCGGGCGAGATCccaggacggtgaactccatcagttc-5'	Cebador reverso amplificación crtB (codón de parada)
D2406	5' -CTCTGGCAGCGCCCGCTC tga ggtagtcaag-3' 3' -GAGACCGTCGCGGGCGAGccaggacggtgaactccatcagttc-5'	Cebador reverso amplificación Ros1 (añade extensión C-terminal)

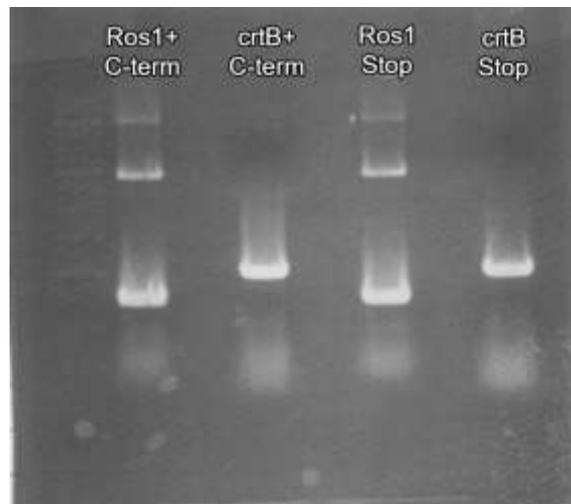


Figura 8: Electroforesis de los productos de PCR de Rosea1 y crtB.

En esta ocasión el vector se ensambló en un orden distinto al experimento anterior. En el caso de GFP se comenzó pasando el inserto a un plásmido intermedio por ensamblaje Gibson y después se incorporó al vector final por ligación, mientras que en esta ocasión decidimos ligar primero los fragmento NcoI-PfI23II de los plásmidos intermedios pTTMVΔCP3Z y pTTMVΔCP3Z-AGA al plásmido vector pGTMV. Mediante este proceso conseguimos los plásmidos pGTMV-NZ y pGTMV-Z, que permiten la construcción de vectores análogos a los TMV-GFP en un único paso tras seleccionar la proteína heteróloga que se desee incorporar. En nuestro caso, decidimos construir versiones análogas a GFP-NC y GFP-0 para Rosea1 y crtB por ensamblaje Gibson. Las construcciones, que se resumen en la Tabla 4, se confirmaron por digestión analítica y análisis electroforético.

Tabla 4: Esquematación de las construcciones Ros1 y crtB.

Nombre	Cebador reverso	Plásmido utilizado	Extensión N-terminal	Extensión C-terminal
Ros1-NC	D2405	TMV-NZ	Sí	Sí
Ros1-0	D2349	TMV-Z	No	No
crtB-NC	D2406	TMV-NZ	Sí	Sí
crtB-0	D2351	TMV-Z	No	No

Una vez comprobada la integridad de las construcciones, transferimos los plásmidos a *A. tumefaciens* C58C1 y procedimos a infiltrar tejido de *N. benthamiana*. Las hojas agroinfiltradas con las dos versiones de TMV-Ros1 sufrieron necrosis a partir de 5 DPI, mientras que las de TMV-crtB desarrollan clorosis en el halo de infiltración y no se apreció la acumulación de carotenoides en las mismas (Figs. 9 y 10).

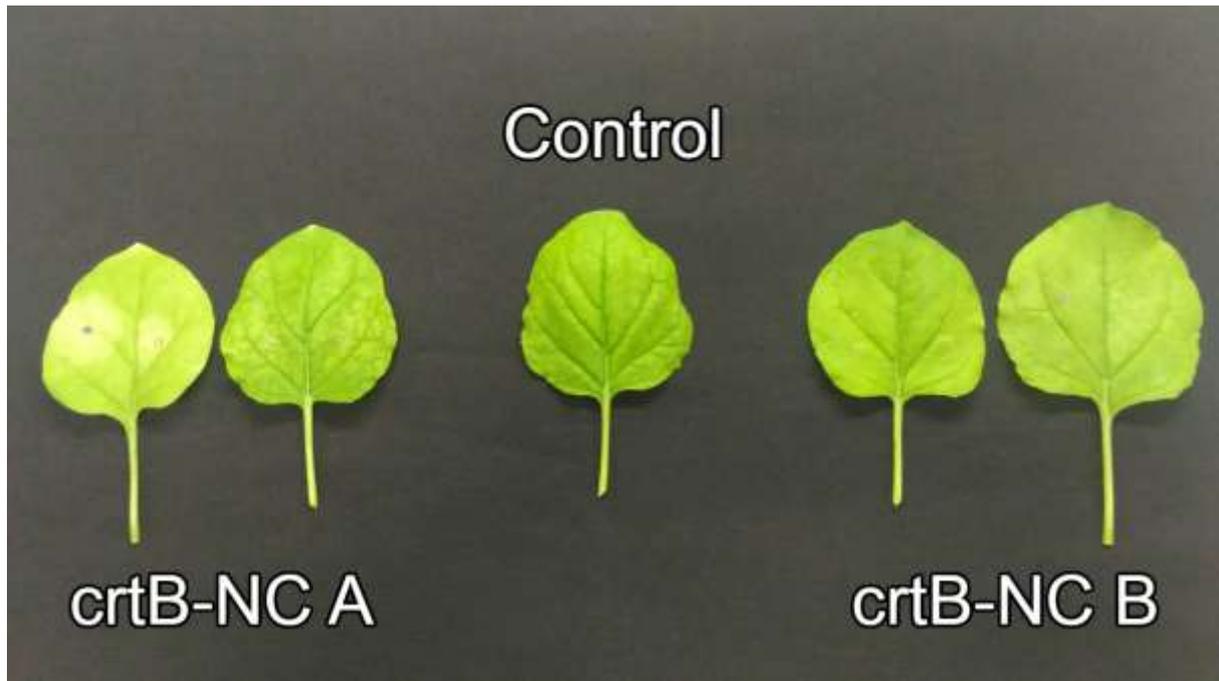


Figura 9: Hojas de *N. benthamiana* infiltradas con dos clones independientes (A y B) de TMV-crtB-NC (6 DPI).

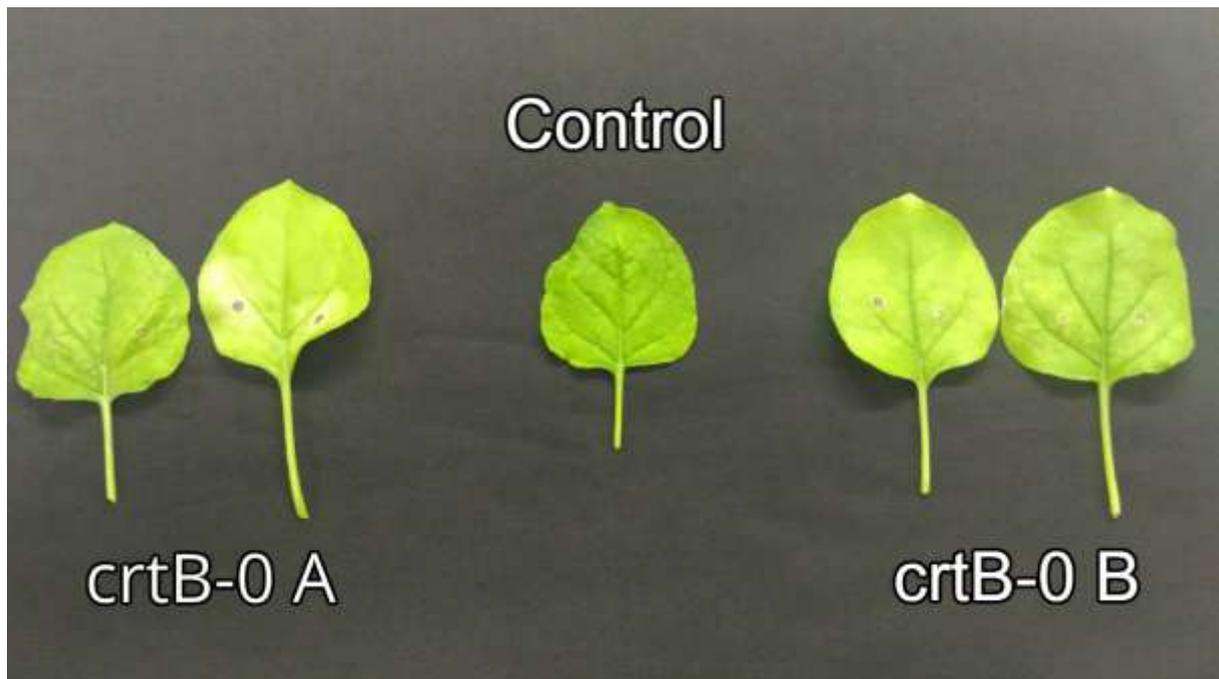


Figura 10: Hojas de *N. benthamiana* infiltradas con dos clones independientes (A y B) de TMV-crtB-0 (6 DPI).

Estos resultados sugieren que los vectores no eran capaces de expresar la proteína recombinante o que los niveles de expresión de proteína que provocaba el vector eran incompatibles con el funcionamiento normal del tejido. Considerando el

segundo supuesto, decidimos diseñar un nuevo experimento en el cual probamos a infiltrar *N. benthamiana* con inóculos de TMV-Ros1-NC y TMV-Ros1-0 a distintas densidades ópticas, obtenidas por diluciones seriadas 1/5 a partir de un inóculo original con DO 0,5. En este caso, pudimos ver de nuevo los efectos de las extensiones en N y C terminal. Los síntomas provocados por TMV-Ros1-NC son más intensos que los de TMV-Ros1-0, que no llega a causar necrosis, mientras que en las muestras de la primera aparecen manchas necróticas incluso a densidades muy bajas (Figs. 11 y 12). Desgraciadamente, las concentraciones más bajas tampoco muestran acumulación de antocianinas como sería esperable cuando Rosea1 se expresa correctamente.

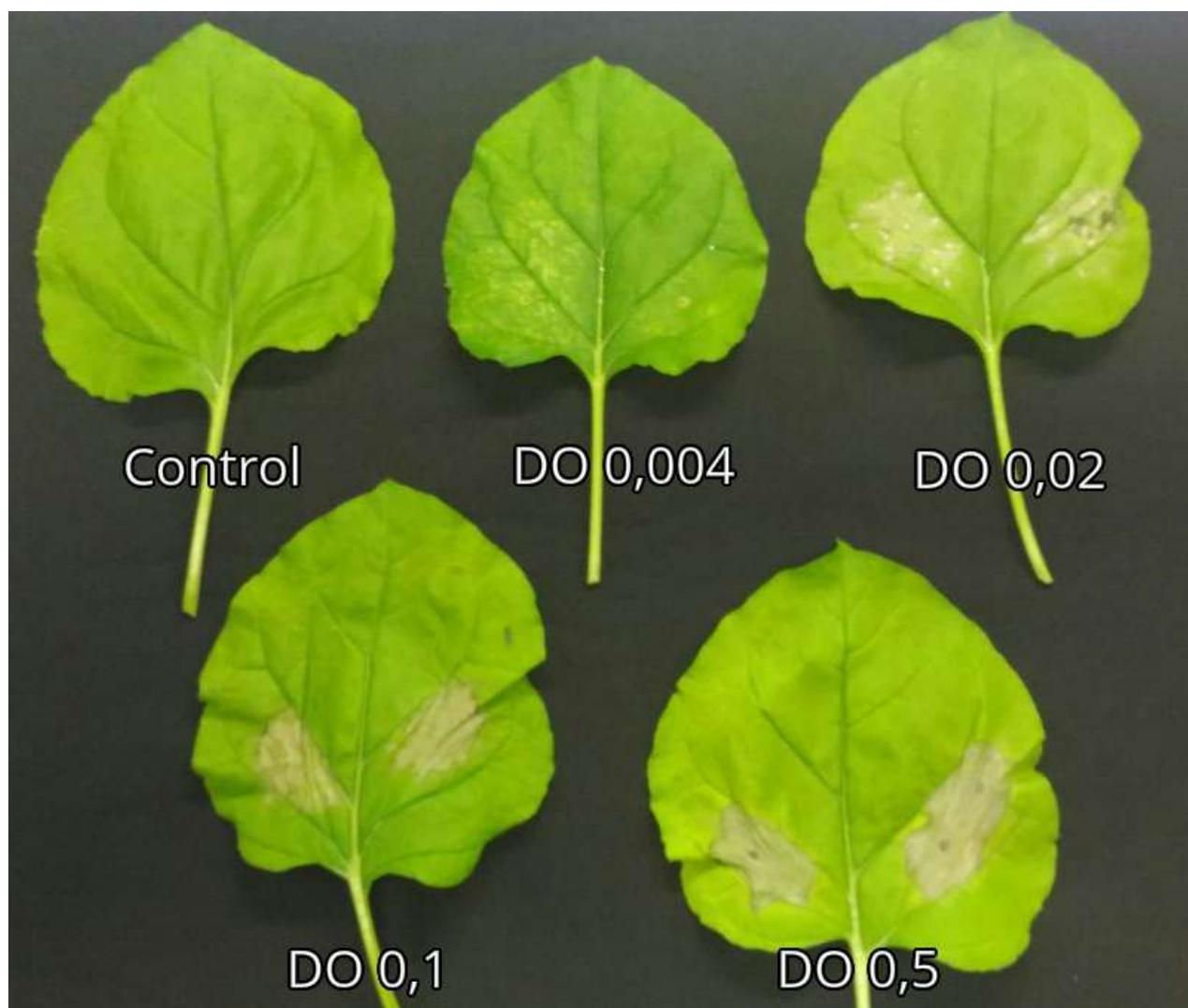


Figura 11: Hojas de *N. benthamiana* infiltradas con TMV-Ros1-NC a distintas densidades ópticas a 600 nm (7 DPI).

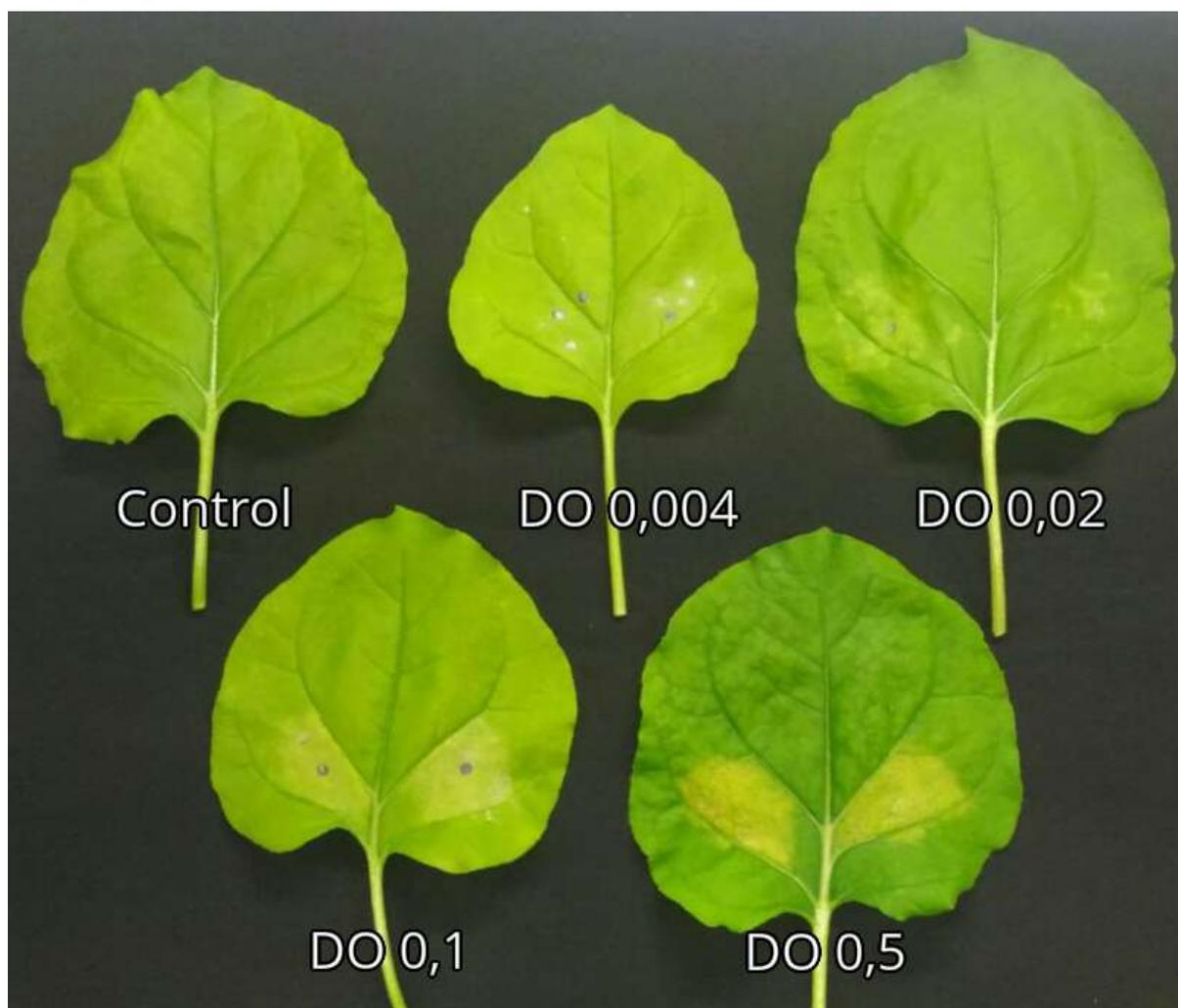


Figura 12: Hojas de *N. benthamiana* infiltradas con TMV-Ros1-0 a distintas densidades ópticas a 600 nm (7 DPI).

En definitiva, el mismo vector que ha permitido producir GFP en cantidades importantes, comparables o incluso mayores que las del vector comercial de Icon Genetics, ha sido incapaz de inducir la acumulación de antocianinas y carotenoides de forma adecuada en hojas de *N. benthamiana*. Este resultado pone de manifiesto la importancia de la naturaleza de la proteína recombinante en el resultado de la expresión. No se puede descartar que el resultado tan negativo obtenido con TMV-Ros1-0 y NC y TMV-crtB-0 y NC esté relacionado con una interacción con los *A. tumefaciens* que se utilizan para lanzar la infección viral. En este sentido, sería interesante probar el funcionamiento de estos vectores aplicados a la planta por métodos alternativos a la infiltración, como podría ser la inoculación mecánica de partículas virales o la administración de *A. tumefaciens* con los clones virales mediante pulverización de las plantas con detergentes.

CONCLUSIONES

Según los resultados experimentales obtenidos en este trabajo, podemos concluir:

1. Las extensiones nativas amino y carboxilo terminales de la proteína de cubierta (CP) del virus del mosaico del tabaco (TMV) tienen un efecto positivo y aditivo en los niveles de expresión de la proteína fluorescente verde en un vector derivado del TMV que induce la fusión traduccional de estos polipéptidos a la proteína recombinante.
2. Sin embargo, los ensayos del mismo vector con el factor de transcripción Rosea1 de la ruta de las antocianinas y de la fitoeno sintasa (crtB) de la ruta de los carotenoides no han dado resultados satisfactorios en lo que a la producción de estos metabolitos en plantas se refiere.

REFERENCIAS

Baulcombe D.C., Chapman S. and Santa Cruz S. (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant Journal*. **7**: 1045-1053.

Bedoya L.C., Martínez F., Orzáez D. and 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.

Desai P.N., Shrivastava N. and Padh H. (2010). Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances* **28**: 427-435.

Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., Venter J.C., Hutchison C.A., 3rd and Smith H.O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* **6**: 343-345.

Giritch A., Marillonnet S., Engler C., van Eldik G., Botterman J., Klimyuk V. and 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 of the USA* **103**: 14701-14706.

Gleba Y., Klimyuk V. and Marillonnet S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **18**: 134-141.

Gleba Y.Y., Tusé D. and Giritch A. (2014). Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **375**: 155-192.

Lindbo J.A. (2007). TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiology* **145**: 1232-1240.

Majer E., Daròs J.A. and Zwart M.P. (2013). Stability and fitness impact of the visually discernible Rosea1 marker in the Tobacco etch virus genome. *Viruses* **5**: 2153-2168.

Majer E., Llorente B., Rodríguez-Concepción M. and Daròs J.A. (2016). Rewiring carotenoid biosynthesis in plants using a viral vector. *Submitted to Scientific Reports*.

Paul M. and Ma J.K. (2011). Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **58**: 58-67.

Shivprasad S., Pogue G.P., Lewandowski D.J., Hidalgo J., Donson J., Grill L.K. and Dawson W.O. (1999). Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology* **255**: 312-323.

Thole V., Worland B., Snape J.W. and Vain P. (2007). The pCLEAN dual binary vector system for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Physiology*. **145**: 1211-1219.

Tuse D., Tu T. and McDonald K.A. (2014). Manufacturing economics of plant-made biologics: case studies in therapeutic and industrial enzymes. *Biomed Research International* 2014: 256135.

Valero Rodríguez, M.C. Optimización de la técnica de Agroinfección para la producción de proteínas en plantas de *N. benthamiana*. Trabajo de fin de Máster. 2016; Universitat Politècnica de Valencia.