

Resumen

Los virus de plantas son parásitos intracelulares obligados que tienen la capacidad de forzar las células del huésped a sintetizar cantidades importantes de proteínas virales. Esta capacidad de los virus de plantas ha sido utilizada para desarrollar vectores virales y expresar proteínas heterólogas en plantas biofactoria. Existen algunos ejemplos de vectores virales que han demostrado una capacidad para modificar rutas metabólicas endógenas de productos naturales silenciando ciertos genes o expresando factores de transcripción y enzimas metabólicas. La principal limitación de muchos sistemas basados en virus de plantas es la dificultad de coexpresar diversas proteínas heterólogas en la misma célula con la localización subcelular apropiada, lo cual es una cuestión crucial en ingeniería metabólica, ya que las rutas metabólicas se componen de muchas enzimas localizadas en varios orgánulos subcelulares.

Este trabajo presenta una solución para superar este problema mediante el uso de un vector viral basado en un potyvirus. Los potyvirus (género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*) son virus de RNA de cadena positiva simple que tienen una estrategia de expresión génica que permite la producción de la mayoría de las proteínas virales en cantidades equimolares. El genoma codifica una poliproteína principal, que es procesada por las proteasas virales en alrededor de diez proteínas maduras. Los cDNAs de las proteínas heterólogas se pueden insertar en el genoma viral flanqueados de secuencias correspondientes a sitios de procesamiento proteolítico de las proteasas virales, que liberan las proteínas insertadas durante el procesamiento de la poliproteína. Basado en un clon infeccioso del virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV) Bedoya *et al.* (2010) desarrollaron un sistema de expresión en el que el gen de la RNA polimerasa dependiente de RNA (NIb) fue sustituido por un casete de expresión, que albergaba varias proteínas heterólogas. Este vector viral fue capaz de expresar tres

proteínas fluorescentes con localización nucleocitoplásmica en cantidades equimolares en plantas de tabaco transgénicas que complementaban el cistron N1b en *trans*.

A pesar de la aparente simplicidad de la estrategia de expresión génica de los potyvirus, la inserción de un cDNA foráneo es una tarea complicada, ya que estas secuencias pueden interrumpir algunas funciones virales que influyen negativamente en la viabilidad del virus recombinante. Por lo tanto, nuestro primer objetivo fue analizar el efecto de la inserción en la estabilidad del genoma de TEV mediante la reubicación del cistron N1b a todas las posibles posiciones intercistónicas del genoma y ensayar la viabilidad de los virus quiméricos. Como resultado de este trabajo, descubrimos una nueva posición de inserción en el extremo amino-terminal de la poliproteína viral que nos permitió explorar otras cuestiones sobre la expresión de proteínas recombinantes utilizando el vector viral.

Dado que las vías metabólicas son muy compartimentalizadas, la adecuada localización subcelular de enzimas es una tarea esencial en ingeniería metabólica. Por eso, nuestro segundo objetivo se centró en la distribución de las proteínas heterólogas expresadas con el vector viral a diferentes orgánulos subcelulares. cDNAs que codificaban la proteína fluorescente verde (green fluorescent protein, GFP) fusionada a péptidos señal se insertaron en la nueva posición amino-terminal y en un sitio interno, sustituyendo el cistron N1b, para enviarla al cloroplasto, núcleo y a la mitocondria. Nuestros resultados mostraron que para la distribución de proteínas al cloroplasto y mitocondria, los genes foráneos deben ser insertados en el sitio amino-terminal del vector viral, pero para la distribución nuclear, ambas posiciones son adecuadas. Demostramos también que el sitio de inserción utilizado afecta la acumulación de las proteínas recombinantes y la estabilidad del vector viral. El sitio amino-terminal resultó ser más adecuado para producir cantidades más grandes de proteínas recombinantes, pero el sitio de inserción interno demostró ser más estable. En base a estos resultados, hemos sido capaces de distribuir dos proteínas fluorescentes distintas a los cloroplastos y núcleos desde un único vector viral.

El último objetivo de este trabajo fue estudiar si el vector viral basado en potyvirus es capaz de expresar una ruta biosintética de múltiples pasos en células vegetales. Para ello nos propusimos producir licopeno, un pigmento vegetal con propiedades beneficiosas para la salud humana, que se sintetiza en los cloroplastos y

cromoplastos desde los precursores de isoprenoides, el pirofosfato de isopentenilo (isopentenyl diphosphate, IPP) y el pirofosfato de dimetilalilo (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) a través de la ruta de metileritriol 4-fosfato (methylerythriol 4-phosphate, MEP). Sin embargo, estos precursores también se sintetizan fuera de los plastos a través de la ruta mevalonato (mevalonate, MVA). Para producir licopeno insertamos un cDNA que codificaba las enzimas de una ruta metabólica de tres pasos de origen bacteriano en el vector viral que debía convertir IPP y DMAPP citosólico en licopeno. Las plantas de tabaco infectadas con el vector viral desarrollaron síntomas de color naranja indicando la acumulación de licopeno, que fue confirmado por análisis de cromatografía líquida de alta eficacia (high-performance liquid chromatography, HPLC) y observaciones de microscopía. Nuestros resultados también ilustraron el papel central del fitoeno sintasa en la ruta biosintética de los carotenoides y se demostró que la sola expresión de la fitoeno sintasa de *Pantonea ananatis*, crtB, es suficiente para inducir la acumulación de carotenoides que confieren una coloración amarilla al tejido infectado.

Ensayamos crtB como sistema reportero visual en varias especies de plantas de importancia tanto científica como agronómica. CrtB resultó ser un marcador visual más general que Rosea1, el marcador rojo basado en la acumulación de antocianinas descrito anteriormente, ya que fue funcional en especies de plantas en las que Rosea1 fue incapaz de detectar la presencia viral. Además, los marcadores crtB y Rosea1 en conjunto fueron utilizados con éxito para seguir con dos colores distintos, amarillo y rojo, dos poblaciones virales al mismo tiempo.