

BV15. Efecto de LEC2 sobre la expresión de proteínas heterólogas en hojas de *Nicotiana benthamiana*

Ocampo, C.G.*; Petruccelli, S.

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) - Departamento de Ciencias Biológicas - Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. *carolina.g.ocampo@gmail.com

Las plantas son el sistema más económico y seguro para la producción de proteínas farmacéuticas e industriales. Muchas de estas proteínas requieren de un procesamiento típico de la vía secretoria para alcanzar una conformación activa y soluble. En sistemas como células de mamíferos y levaduras, la síntesis de proteínas foráneas en esta vía se encuentra limitada por la capacidad de plegamiento y transporte, utilizándose estrategias de ingeniería celular para superar estas limitaciones e incrementar los rendimientos. En células vegetales este tipo de estrategias no se han explorado. El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto del factor de transcripción LEC2, vinculado a la síntesis de reservas en semillas, en la producción de proteínas foráneas en hojas. La hipótesis planteada es que la expresión ectópica de LEC2 produciría cambios en el desarrollo de la vía secretoria conduciendo a mayores niveles de acumulación. Con este fin se utilizaron diferentes genes reporteros dirigidos por el promotor CaMV35S y el factor de transcripción LEC2 como efector que fueron introducidos en hojas de *Nicotiana benthamiana* utilizando agrobacterias, comparándose los resultados obtenidos con y sin efector. LEC2 no se une al promotor CaMV35S y los efectos observados serían indirectos. Primero se estudió el impacto de LEC2 en la localización de marcadores fluorescentes de la vía secretoria mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM). GFP-HDEL (marcador del Retículo Endoplásmico, ER) y ST-GFP (marcador del Golgi) presentaron la misma localización en ambos casos, mientras que los marcadores de compartimientos prevacuolares (PVC), GFP-BP80, y vacuola, RFP-AFVY, son secretados en presencia de LEC2, indicando una alteración post-Golgi del funcionamiento de la vía. Los análisis realizados por inmunoblot, mostraron que LEC2 produce aumentos de 2,5- 3,5 veces en la acumulación de proteínas retenidas en el ER y de 3- 6 veces para proteínas vacuolares. La presencia fluorescencia de GFP-BP80 en el apoplasto llamó la atención ya que GFP suele ser inestable a pH ácido, por ello se estudió el pH del apoplasto in vivo mediante CLSM en plantas de *Arabidopsis thaliana* Apo-pHusion que expresan de forma estable el sensor de pH mRFP1-EGFP direccionado a apoplasto, observándose un aumento del pH en hojas infiltradas con LEC2 respecto a controles sin infiltrar o infiltrados con un vector vacío. Teniendo en cuenta que se ha informado que el apoplasto es un compartimiento proteolítico se decidió evaluar la actividad proteolítica. Usando azocaseína se evaluó la actividad de extractos

de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con un vector vacío o LEC2, obteniéndose valores de actividad del 50% y 25%, respectivamente, respecto a hojas sin infiltrar. En conclusión, demostramos que la expresión de LEC2 los niveles de acumulación de reporteros en la vía secretoria siendo una estrategia novedosa potencialmente aplicable tanto para plataformas de producción transitorias como estable.