



Expresión de proteínas recombinantes en plantas mediante el uso de vectores virales

Apellidos, nombre	Carmelo López del Rincón ¹ (clopez@upvnet.upv.es) María Ferriol Molina ² (mafermo@upvnet.upv.es)
Departamento	¹ Departamento de Biotecnología ² Departamento de Ecosistemas Agroforestales
Centro	Universitat Politècnica de València



1 Resumen de las ideas clave

La biotecnología vegetal se apoya en dos enfoques para introducir y expresar genes heterólogos en plantas: la transformación genética estable y la expresión transitoria utilizando vectores virales. En este artículo docente se revisan las ventajas e inconvenientes de los dos enfoques, haciendo especial hincapié en la expresión transitoria de proteínas a partir de vectores virales de la primera generación que son aquéllos que emplean el virus completo para promover la infección.

2 Introducción

¿Cómo se pueden introducir y expresar genes heterólogos en plantas? Una posibilidad es mediante la transformación genética estable. Con esta estrategia, un fragmento de ADN que incluye el gen de interés es integrado en el genoma nuclear o de cloroplastos. De esta manera, el nuevo carácter es heredado a través de las generaciones y las plantas transgénicas obtenidas pueden ser fácilmente multiplicadas para la producción de la proteína de interés.

Otra posibilidad es mediante el empleo de vectores virales. Con esta estrategia se consigue una expresión transitoria de los genes heterólogos, pero como el gen no se incorpora en el genoma de la planta, no es una característica heredable. En los vectores de la primera generación se introduce el gen de interés en el genoma del virus completo de manera que éste mantenga sus funciones intactas. Las plantas infectadas con el virus modificado serán capaces de producir elevadas cantidades de proteína recombinante en un corto periodo de tiempo.

3 Objetivos

Una vez que el alumno lea con detenimiento este documento, será capaz de:

- Entender porqué es posible conseguir grandes cantidades de proteína recombinante empleando vectores virales.

- Entender cómo se desencadena la infección sistémica con el vector viral.

4 Desarrollo

4.1 ¿Cuáles son los inconvenientes de expresar genes mediante la transformación convencional?

Mediante la transformación genética estable de plantas es posible obtener proteínas recombinantes de alto valor añadido, pero este es un proceso largo y costoso que presenta algunas desventajas importantes:

- Con la transformación nuclear muchas veces se obtienen bajos niveles de expresión, principalmente debido a problemas relacionados con el lugar de inserción del gen introducido en el genoma vegetal y con el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), mecanismo que elimina la expresión de las proteínas recombinantes en un corto periodo de tiempo.
- Con la transformación de cloroplastos se obtienen mayores niveles de expresión, pero la ausencia de modificaciones post-traduccionales debido a su origen procariota, sólo haría compatible este sistema con la producción de proteínas que no requieran ese tipo de procesamiento.

4.2 ¿Cuáles son las ventajas de expresar genes mediante vectores virales?

Las ventajas que ofrece este sistema con respecto a la transformación genética estable son las siguientes:

- Los vectores virales son muy prometedores debido a la rapidez y facilidad de manipulación mediante ingeniería genética y a que no se necesitan grandes requerimientos técnicos, ni tener que pasar por una etapa de cultivo *in vitro* obligatoria.
- Permite obtener elevadas concentraciones de proteína recombinante en un corto periodo de tiempo, normalmente una o dos semanas después de la inoculación del vector viral (Figura 1).

- Muchos virus de plantas son fácilmente transmisibles y pueden ser utilizados comercialmente para la rápida inoculación de grandes superficies de plantas de cultivo.
- Es aplicable a una amplia gama de plantas del mismo genotipo o plantas con diferente fondo genético y en los estadios más convenientes de su desarrollo.
- Evita el debate suscitado sobre la obtención y uso de plantas transgénicas.

4.3 ¿Por qué la producción de proteínas recombinantes es tan elevada cuando se emplean vectores virales?

Una de las características que los hacen atractivos para su uso a nivel biotecnológico, es que los virus son capaces de alterar y utilizar a su favor toda la maquinaria molecular de las células vegetales infectadas, en funciones como la replicación, la transcripción y la traducción, para multiplicarse rápidamente y moverse sistémicamente a lo largo de toda la planta. Este hecho posibilita que un gen foráneo insertado en el genoma viral se exprese y acumule de forma similar a otros genes virales, es decir, en cantidades potencialmente altas, durante el relativamente corto lapso de tiempo en que se establece y extiende la infección viral, en tejidos vegetales variados como hojas, tallos y raíces, y en un virtualmente amplio espectro de plantas según sea la gama de huéspedes del virus empleado (Scholthof y col., 1996). En la figura 1 se representa de forma esquemática los diferentes niveles de expresión de una proteína recombinante obtenidos mediante transformación genética estable y por medio de vectores virales.

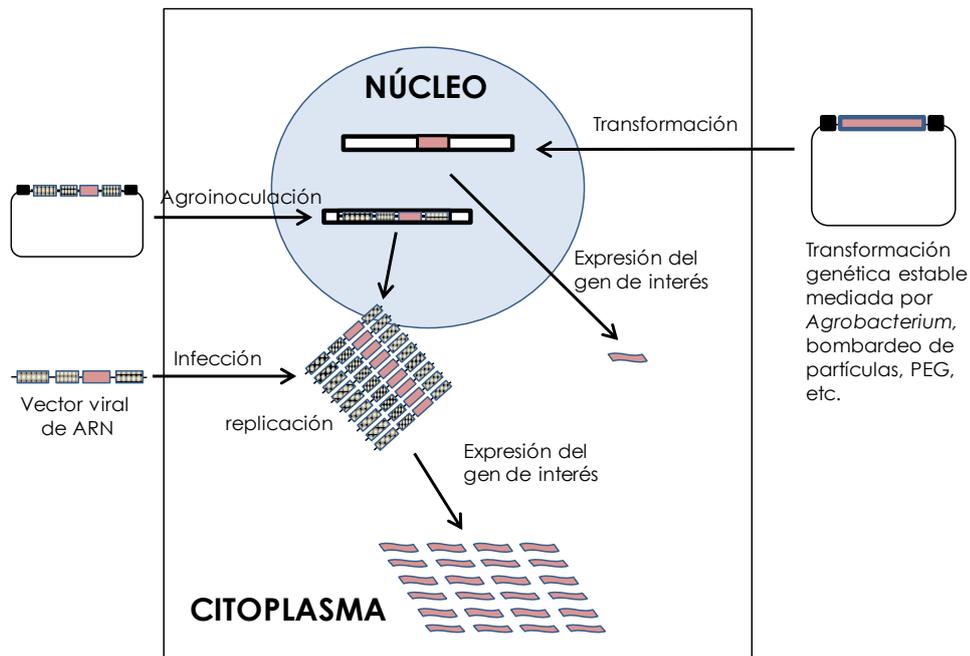


Figura 1. Comparación de los niveles de proteína recombinante () obtenidos a partir de un gen de interés introducido en el genoma de la planta mediante transformación genética estable (rectángulo rosa en el cromosoma blanco) con la obtenida a partir de un vector viral con replicación autónoma, introducido en la planta mediante inoculación mecánica (infección) o agroinoculación, al que se le ha clonado el mismo gen (rectángulo rosa). Esquema adaptado de Scholthof y col. (1996).

4.4 ¿Cómo se consigue la infección sistémica con el vector viral?

Los vectores de primera generación son virus funcionales, conteniendo todos sus genes, a los que se les integra el gen de interés (vectores de inserción). Debido a que disponen de todas las funciones virales son capaces de causar una infección sistémica en la planta. La inoculación de los mismos en la planta se puede hacer mecánicamente mediante viriones maduros o copias infectivas del genoma viral, o mediante infiltración del tejido vegetal con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con la construcción de interés (Figura 1). Esta última técnica es conocida como “agroinoculación o agroinfiltración”. A partir del punto inicial de infección, las partículas virales que acarrean el gen de interés se esparcen a través de la planta para provocar una infección sistémica, asegurando así altos niveles de expresión de la proteína de interés (Figura 2).

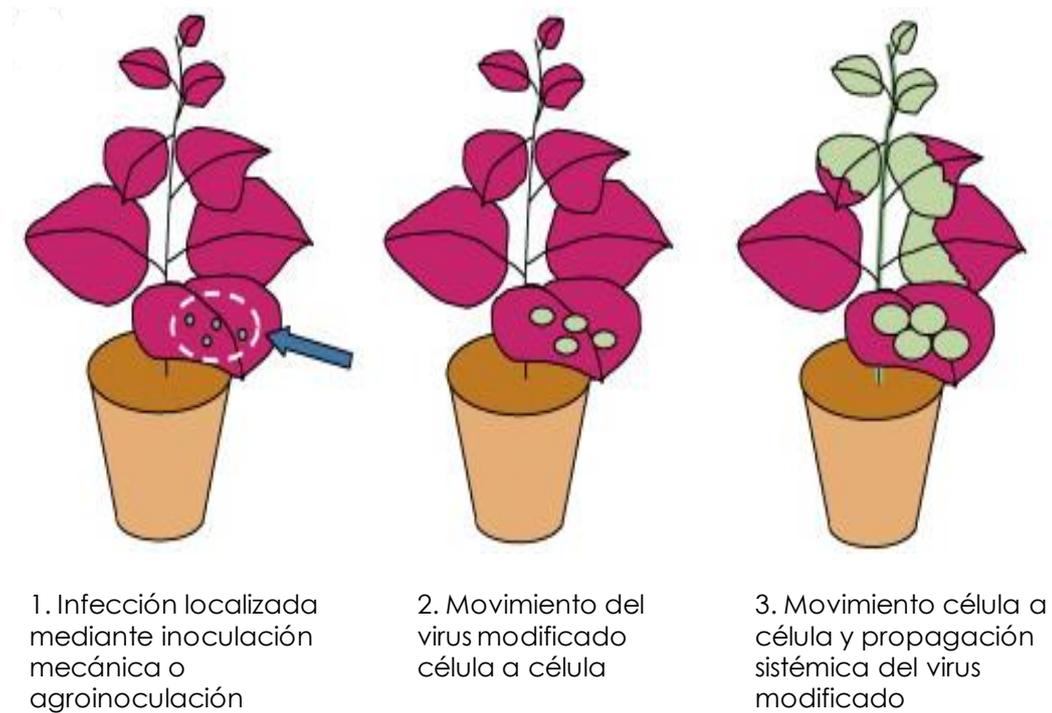


Figura 2. Descripción esquemática de la infección y diseminación de vectores virales de primera generación. Adaptado de Gleba y col. (2007).

5 Cierre

La utilización de virus de plantas como vectores de expresión tiene un enorme potencial para la expresión de proteínas recombinantes, y constituyen una excelente alternativa a los enfoques transgénicos más convencionales. Hasta la fecha, los mejores resultados se han obtenido con vectores contruidos sobre la columna vertebral de virus de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva tales como el virus del mosaico del tabaco (TMV) o el virus X de la patata (PVX).

Este tipo de vectores se han empleado con éxito para expresar numerosas proteínas. Sin embargo, una de sus mayores limitaciones radica en el tamaño de la secuencia foránea que pueden albergar sin comprometer la estabilidad de la partícula viral. Otras restricciones para su uso se relacionan con la incapacidad del virus de colonizar homogéneamente todos los tejidos de la planta y con la inestabilidad y pérdida de los genes exógenos clonados debido a fenómenos de recombinación, con la consiguiente reversión a virus no recombinante y la pérdida de la secuencia de interés.



6 Bibliografía

6.1 Referencias de fuentes electrónicas:

Gleba, Y., Klimyuk, V. y Marillonnet, S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY* 18, 134-141.

Scholthof, H. B., Scholthof, K. B. y Jackson, A. O. (1996). Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *ANNUAL REVIEW OF PHYTOPATHOLOGY* 34, 299-323.