



Desarrollo de vectores virales de plantas

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

Existen dos métodos para producir proteínas recombinantes en plantas: la transformación estable del genoma nuclear o de cloroplastos y la expresión transitoria mediante vectores virales.

En este artículo se presentan las estrategias disponibles para el desarrollo de vectores virales, usados como vehículos para la expresión de genes foráneos en plantas.

2 Introducción

¿Qué sistemas hay disponibles para producir proteínas recombinantes? Por una parte, se pueden usar sistemas microbianos como bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Con estos sistemas es posible obtener altas concentraciones de proteínas, pero a veces presentan un incorrecto procesamiento post-traducciona l por lo que son inactivas. Por otra parte, también es posible emplear cultivos de células animales, o directamente animales transgénicos como vacas, cerdos, conejos, ovejas y cabras, para la producción de proteínas recombinantes principalmente a través de la leche. Estos sistemas presentan la ventaja evidente de poder obtener proteínas activas, pero conllevan importantes desventajas como son los altos costes, el largo tiempo de producción, los altos requerimientos técnicos y tecnológicos, las posibilidades de contaminación con patógenos humanos y los factores éticos propios de manipular este tipo de seres vivos (Gleba y col., 2004).

¿Por qué el uso de plantas como biofactorías constituye una alternativa atractiva y eficaz para producir moléculas específicas de alto valor añadido como metabolitos secundarios con actividad terapéutica, inhibidores, anticuerpos, antígenos, enzimas o biopolímeros? La principal ventaja es que las proteínas obtenidas son activas desde el punto de vista funcional. Además, su mantenimiento y el escalado de la producción, la extracción del producto final, el almacenamiento y el transporte son económicos y suelen ser fáciles y rápidos. Por otro lado, cuentan con la capacidad de compartimentalizar y almacenar las proteínas de forma estable en determinados órganos. Por último, tienen un muy bajo riesgo de contaminación con patógenos o endotoxinas, presentes en sistemas animales y bacterianos, y no suscitan los problemas éticos asociados al manejo de material animal (Gleba y col., 2007).

3 Objetivos

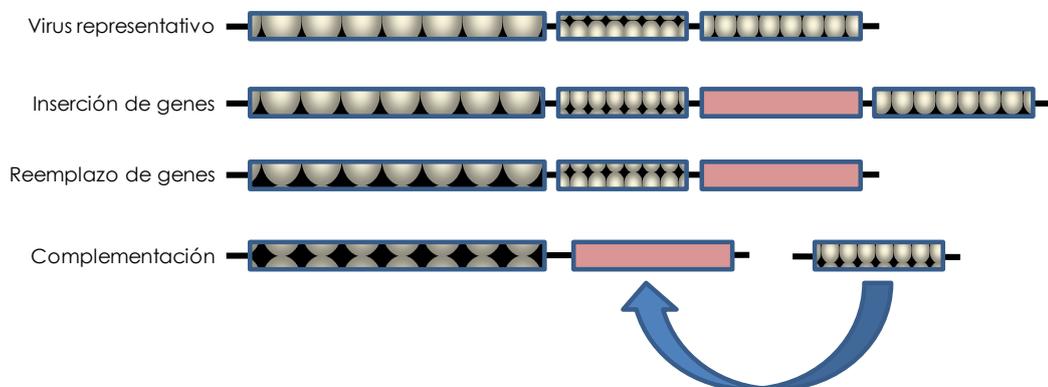
Una vez que el alumno lea con detenimiento este documento, será capaz de:

- Conocer y entender las estrategias disponibles para el desarrollo de vectores derivados de virus de plantas.

4 Desarrollo de vectores virales

Un criterio importante que determina si un virus puede ser adecuado como vector de genes es su capacidad para infectar las plantas huésped de manera eficiente. Son adecuados como vectores los virus que se pueden transmitir mecánicamente con facilidad porque sus genomas suelen ser muy infecciosos.

Como se muestra en la Figura 1, existen varias alternativas para convertir el genoma de un virus en vector viral. La estrategia a utilizar suele ir marcada por limitaciones biológicas del virus en cuestión y/o por su estrategia de expresión génica (Scholthof y col., 1996).



Inserción de genes

Caulimovirus
Geminivirus
Potexvirus
Tobamovirus
Potyvirus

Reemplazo de genes

Bromovirus
Caulimovirus
Furovirus
Geminivirus
Hordeivirus
Potexvirus
Tobamovirus
Tobravirus
Tombusvirus

Complementación

Alfamovirus
Caulimovirus
Diantovirus
Geminivirus
Potexvirus
Tobamovirus
Tombusvirus

Figura 1. Comparación de las estrategias empleadas para expresar genes foráneos (rectángulo rosa). Los rectángulos amarillos representan los genes virales. Esquema adaptado de Scholthof y col. (1996).

4.1 Inserción de genes

Una estrategia consiste en introducir un gen foráneo en el genoma del virus completo de manera que éste mantenga todas sus funciones intactas. Para los virus en los que se expresan los genes por medio de RNAs mensajeros subgenómicos, la construcción del vector viral se hará añadiendo un promotor subgenómico adicional, mientras que para otro tipo de virus el gen de interés se puede clonar en pauta con cualquier gen viral, junto con secuencias que permitan su procesamiento.

El hecho de mantener intacta toda la información necesaria para que el virus sea completamente funcional es una ventaja. Sin embargo, pueden presentarse algunos problemas por las limitaciones sobre la cantidad de material genético exógeno que se puede insertar, como son: (i) el incorrecto ensamblaje de las partículas virales, (ii) la inestabilidad y pérdida del inserto debido a fenómenos de recombinación homóloga o heteróloga, (iii) una reducida gama de plantas huésped, (iv) una evolución más lenta de la infección, o (v) la baja acumulación de la proteína recombinante por problemas en la replicación o el movimiento célula a célula y de larga distancia dentro de la planta (Gleba y col., 2007).

4.2 Reemplazo de genes

Una segunda estrategia consiste en sustituir algún gen viral por el gen foráneo que codifica la proteína recombinante de interés. Esta metodología trata de contrarrestar los problemas impuestos por la limitación de tamaño generada con la estrategia anterior.

Este enfoque requiere que el gen viral no sea esencial. Este requisito obviamente prohíbe la sustitución de genes asociados con la replicación y el movimiento. Sin embargo, los genes que codifican factores de transmisión por insectos son candidatos potenciales para el reemplazo. Asimismo, la proteína de cubierta de muchos virus no es necesaria para la infección sistémica en algunos huéspedes.

4.3 Complementación

En los casos anteriores, los genes foráneos se expresan a partir de vectores virales de replicación autónoma que tienen el potencial de invadir sistémicamente la planta. Aunque estas estrategias tienen ventajas obvias, el reemplazo de genes puede afectar a

funciones esenciales, mientras que la inserción de genes provoca un aumento del tamaño del genoma, pudiendo afectar a la capacidad de ser empaquetado.

Para superar algunos de estos problemas, otra alternativa consiste en insertar los genes foráneos en componentes subvirales defectivos, que para completar el ciclo infeccioso dependen de genes virales introducidos transgénicamente, o de la co-infección con un virus auxiliar para completar algunas funciones esenciales (Figura 1).

En el enfoque de la complementación transgénica, el genoma del virus se "desarma" mediante el reemplazo de un gen esencial por un gen foráneo. El vector viral defectivo se inocula a continuación en plantas transgénicas que expresan el gen del virus "ausente", complementando al vector desarmado.

4.4 Ventajas e inconvenientes de las diferentes estrategias

Las ventajas e inconvenientes de cada una de las tres estrategias se muestran en la siguiente tabla.

Ventajas e inconvenientes de los diferentes tipos de vectores		
Estrategias de clonación	ventajas	inconvenientes
Inserción de genes	<ul style="list-style-type: none"> - Replicación autónoma. - El virus mantiene todas las funciones intactas 	<ul style="list-style-type: none"> - Limitado tamaño del material genético insertado. - Inserción inestable debido a fenómenos de recombinación. - El mayor tamaño del genoma viral puede afectar a algunas funciones del virus como replicación, encapsidación o movimiento sistémico.
Reemplazo de genes	<ul style="list-style-type: none"> - Replicación autónoma. - Posibilidad de insertar genes de mayor tamaño. - Mayor estabilidad. - Mayor bioseguridad 	<ul style="list-style-type: none"> - El virus no mantiene todas las funciones. - Es necesario un conocimiento amplio de los genes no esenciales para que el virus mantenga la infección sistémica. - Problemas de escalado

Complementación	<ul style="list-style-type: none"> - Posibilidad de insertar genes de mayor tamaño. - Mayor estabilidad - Mayor bioseguridad 	<ul style="list-style-type: none"> - Ausencia de replicación autónoma. - Necesidad de expresar los genes ausentes mediante el empleo de virus auxiliares o transformación estable.
------------------------	---	--

5 Cierre

La utilización de virus de plantas como vectores de expresión de genes foráneos tiene un enorme potencial para producir productos comercialmente muy valiosos de uso médico y veterinario, y constituyen una excelente alternativa a los enfoques transgénicos más convencionales. Este enfoque facilita la acumulación de las proteínas en cantidades superiores al 10% de las proteínas solubles totales, durante un corto periodo de tiempo.

Los vectores virales construidos a partir de los virus de ARN de los géneros tobamovirus, potexvirus y potyvirus son los más utilizados para la expresión de grandes proteínas por ser los más versátiles y prácticos. Los virus de estos géneros son fáciles de manipular e inocular, los niveles de replicación y expresión génica son muy elevados, y presentan una gran estabilidad del gen foráneo clonado. Además, son capaces de infectar plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, proporcionando un recurso que puede desarrollarse para la mayoría de los cultivos en muchas áreas geográficas diferentes.

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.

Gleba, Y., Marillonnet, S. y Klimyuk, V. (2004). Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. *CURRENT OPINION IN PLANT BIOLOGY* 7, 182-188.

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.