

Los diferentes sistemas de transferencia de genes en plantas

- **Transferencia mediante vectores naturales**

- *Agrobacterium tumefaciens*
- *Agrobacterium rhizogenes*
- *Virus de ADN” de plantas

- **Transferencia directa**

- **Biolística**
- Silicon carbide fibras: WHISKERS™
- Electroporación
- Incorporación ADN a protoplastos (PEG)
- Plásmidos encapsulados en liposomas
- Microinyección
- Incorporación de ADN mediante láser, ultrasonidos

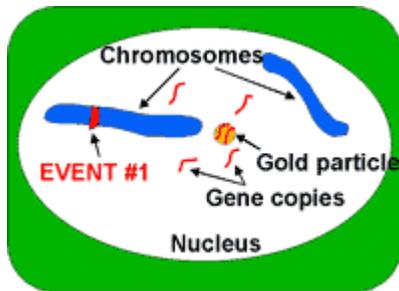
ADN desnudo y permeabilización de la célula

Métodos menos reproducibles. Técnicas usadas para la expresión transitoria de genes

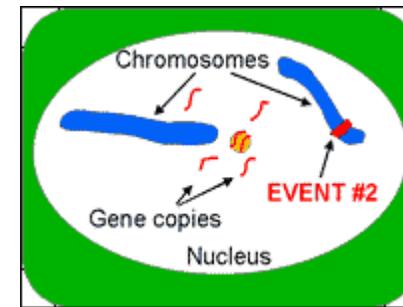


Concepto de evento génico

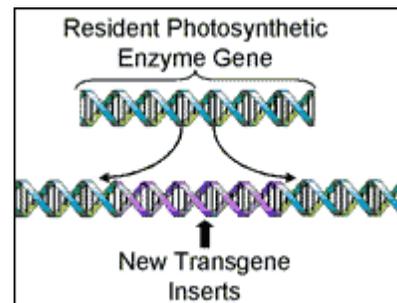
Evento es la inserción de un transgén en una región específica del cromosoma



Un mismo transgén
Distinta ubicación cromosómica
Distintos eventos



Eventos deseables: expresión del transgén sin interrumpir la expresión de ningún gen “residente”. Escasos



Gene transfer techniques...

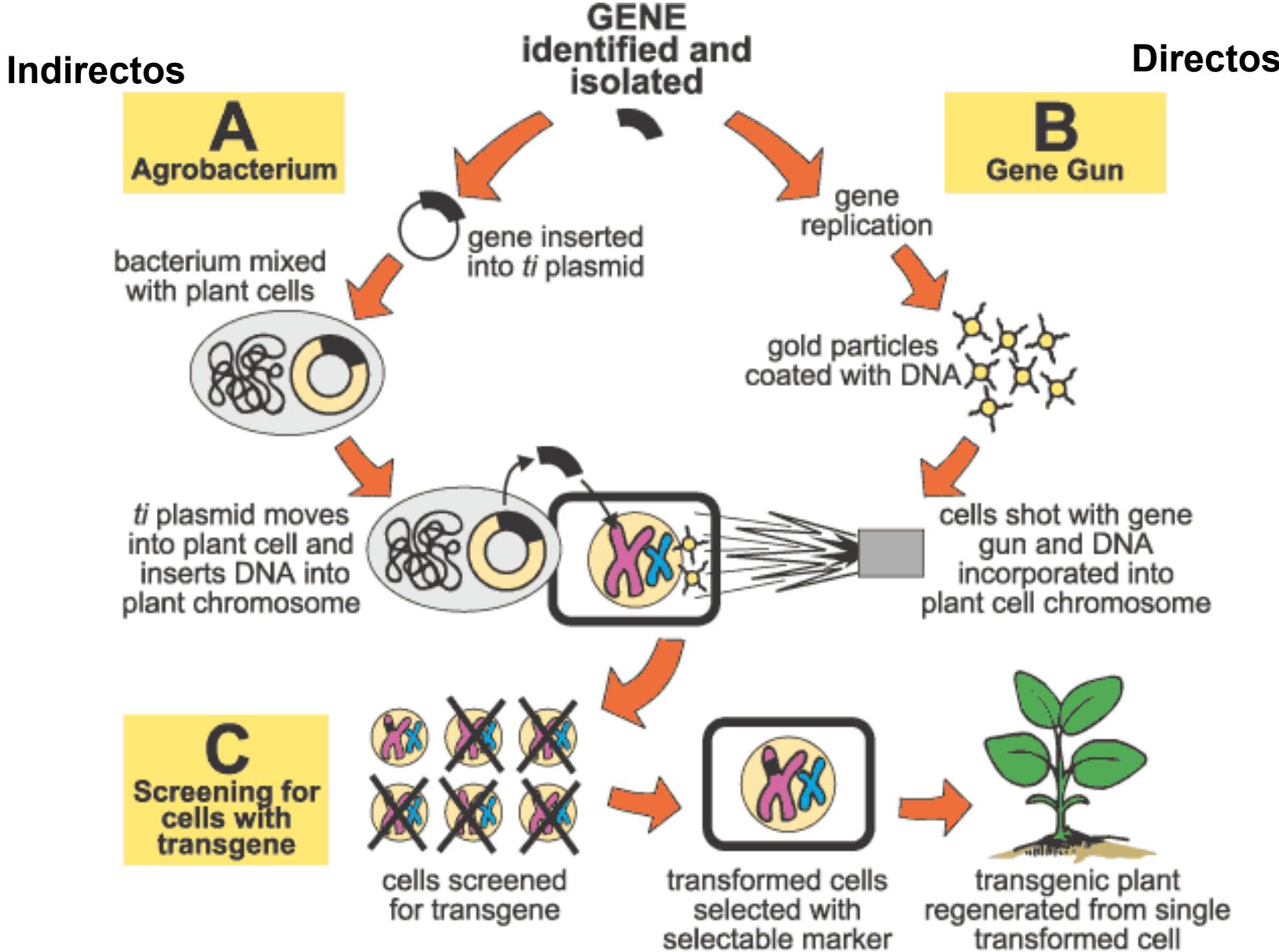


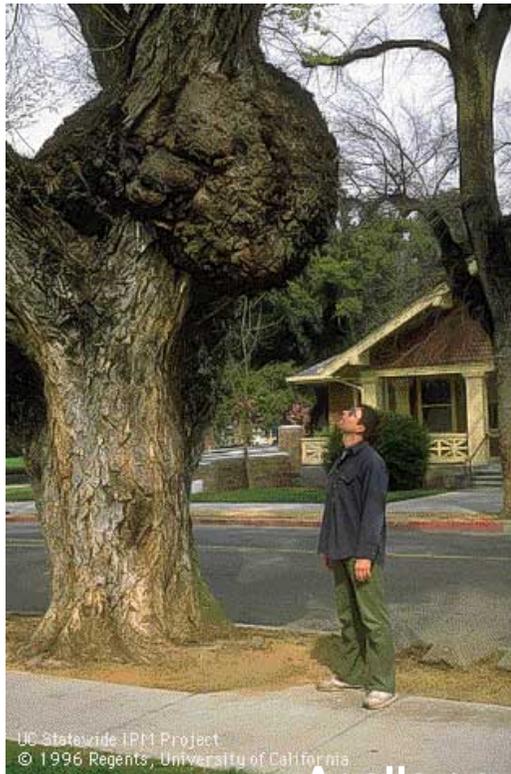
Image source:
<http://www.ext.nodak.edu/extpubs/plantsci/crops/a1219-2.gif>



Agrobacterium: capaz de transferir ADN a eucariotas: plantas, hongos, células humanas (PNAS, 98:1871)

A. tumefaciens y A. rhizogenes

Bacterias del suelo patógenas
Gram negativas
Rhizobiaceae



Formas de ingeniería genética empleadas por la naturaleza

Crecimiento neoplásico: agalla de corona





Hitos históricos

1907. Erwin F Smith y CO Townsend. Dpto Agricultura EE UU

Agente casual enfermedad: A. tumefaciens

Cepas virulentas A. tumefaciens: algunas

Mecanismo de infección: por heridas

1947. Armin C Braun. Inst. Rockefeller de Investigación Médica

Cultivo in vitro del tejido de agalla: libre de bacterias sólo azúcares y sales

Características cultivo: elevada capacidad de proliferación

1960. Georges Morel. Inst. Nacional Investigación Agronómica Versailles

Análisis células tumorales: síntesis de nuevos compuestos: opinas → octopina y nopalina

Síntesis de opinas: depende de la bacteria

Una cepa bacteria crece con nopalina u octopina

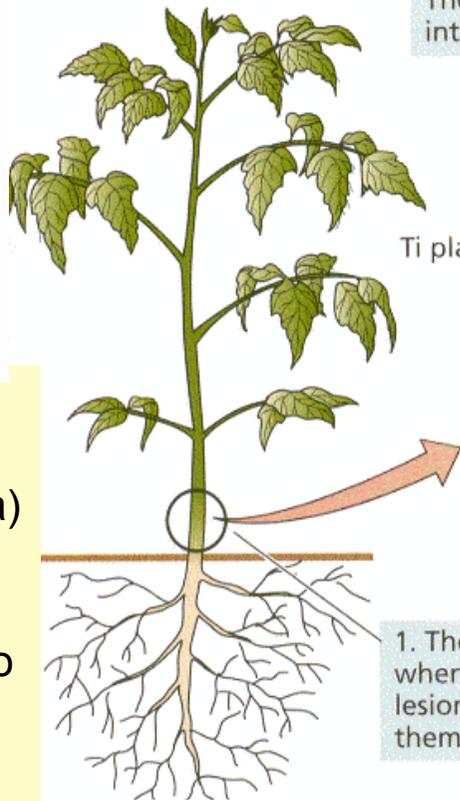
Principio inductor tumor: ADN

1974. Jeff Schell, Marc van Montagu. Universidad de Gante (Bélgica)

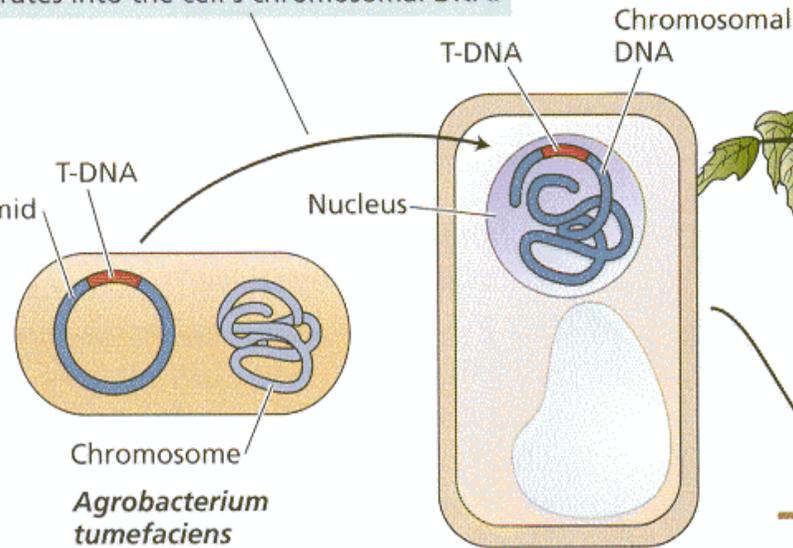
Factor responsable formación tumor: megaplásmido Ti (200 kb)



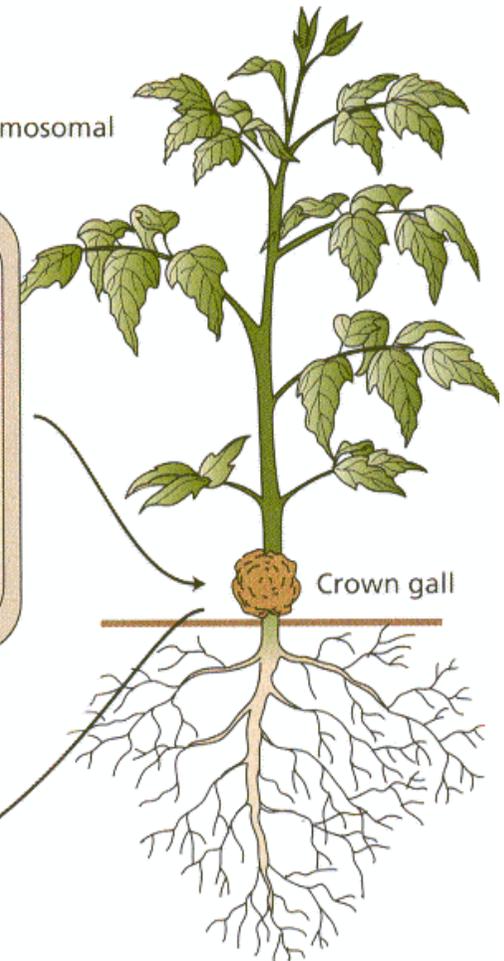
La bacteria (no la planta) puede utilizar las opinas como fuente de nitrógeno



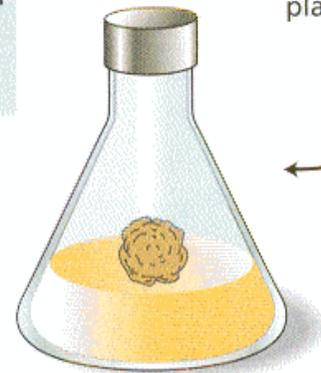
2. A virulent bacterium carries a Ti plasmid in addition to its own chromosomal DNA. The plasmid's T-DNA enters a cell and integrates into the cell's chromosomal DNA.



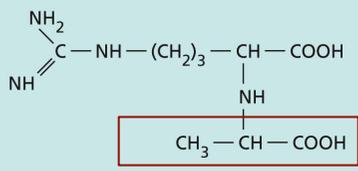
1. The tumor is initiated when bacteria enter a lesion and attach themselves to cells.



3. Transformed cells proliferate to form a crown gall tumor.

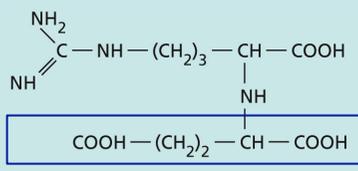
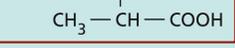


4. Tumor tissue can be "cured" of bacteria by incubation at 42°C. The bacteria-free tumor can be cultured indefinitely in the absence of hormones.



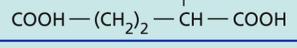
Octopine

Pirúvico



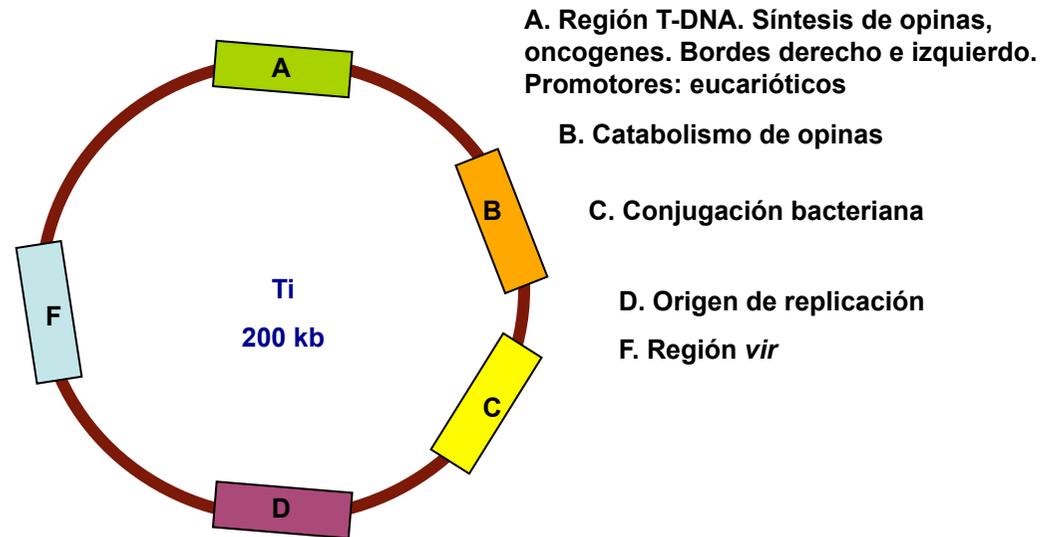
Nopaline

Ácido α-cetoglutarico



Representación esquemática del plásmido Ti (inductor tumores)

Plásmido Ti



➤ **Región T-DNA (ADN transferido):**

- Bordes derecho e izquierdo: 25 bp repetidas. Elementos *cis* necesarios para el procesamiento del T-DNA
- Síntesis de opinas
- Oncogenes
 - *iaaM*, *iaaH*
 - *iptZ*

➤ **Región *vir*: (35 kb) proteínas necesarias para la transferencia de T-DNA**

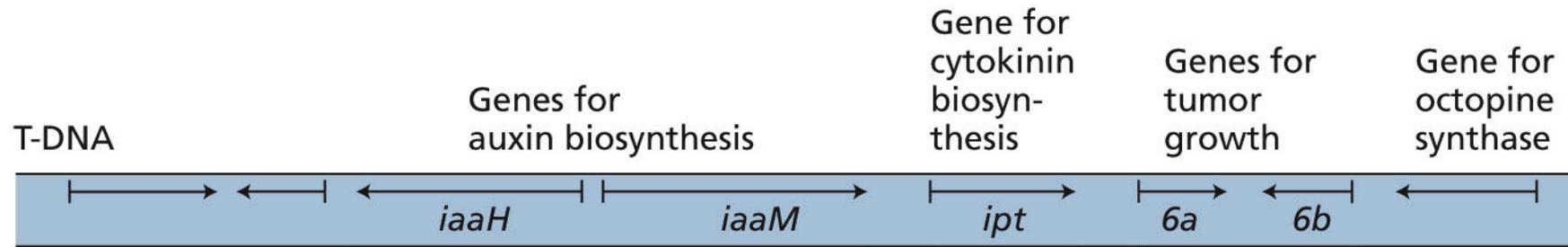
- 7 loci (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virH*) generan una copia del T-DNA y median su transferencia

Cromosoma bacteria

- **Genes *chv*:** implicados movimiento quimiotáctico y unión bacteria a la célula



Mapa del T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*



Mutation or deletion of these regions gives Ti plasmids that initiate tumors with specific characteristics

tms

tmr

tml

Teratomas:
tumores
parcialmente
diferenciados



Shooty tumors produced by *tms* mutations or deletions



Rooty tumors produced by *tmr* mutations or deletions



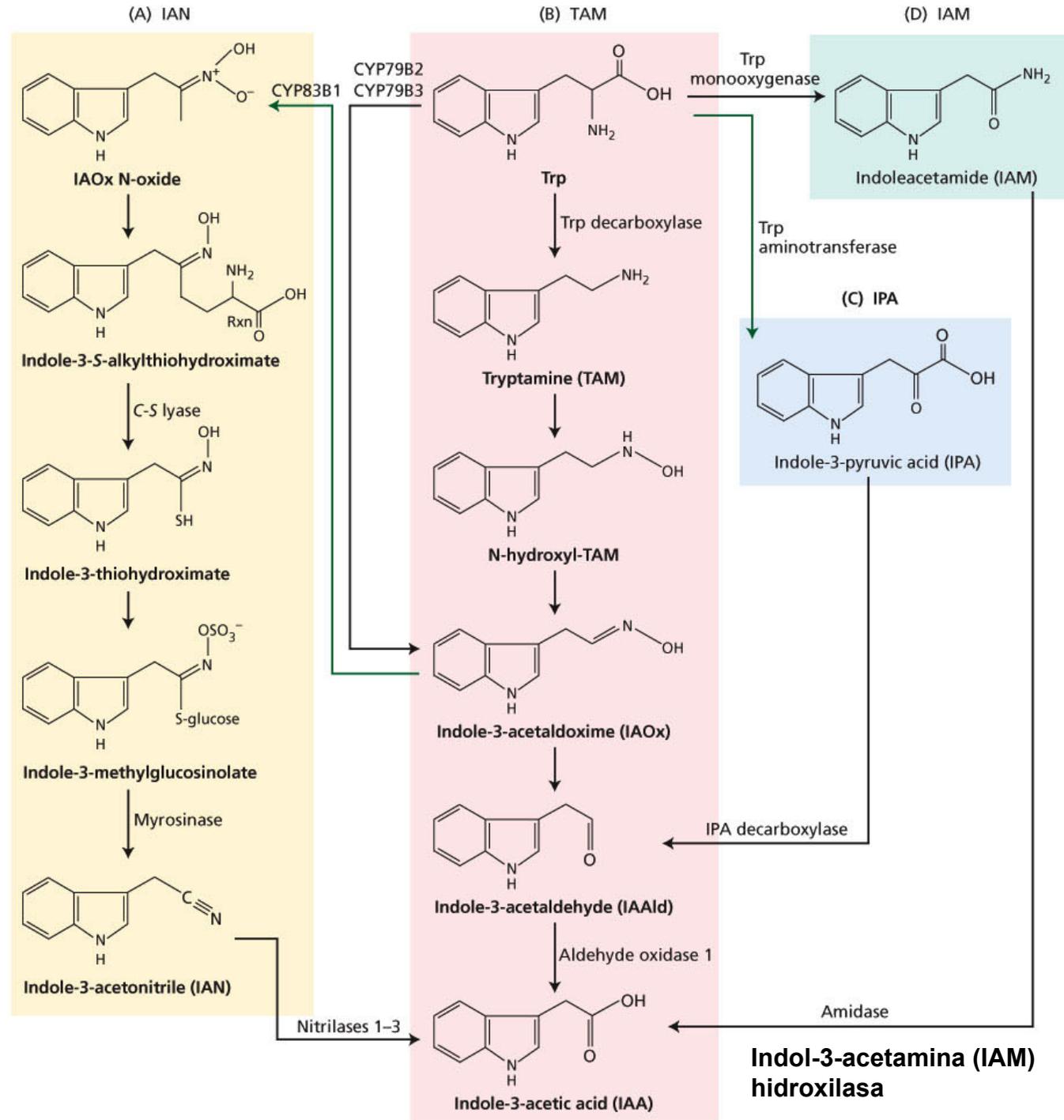
Large, undifferentiated tumors produced by *tml* mutations or deletions



IAA biosíntesis

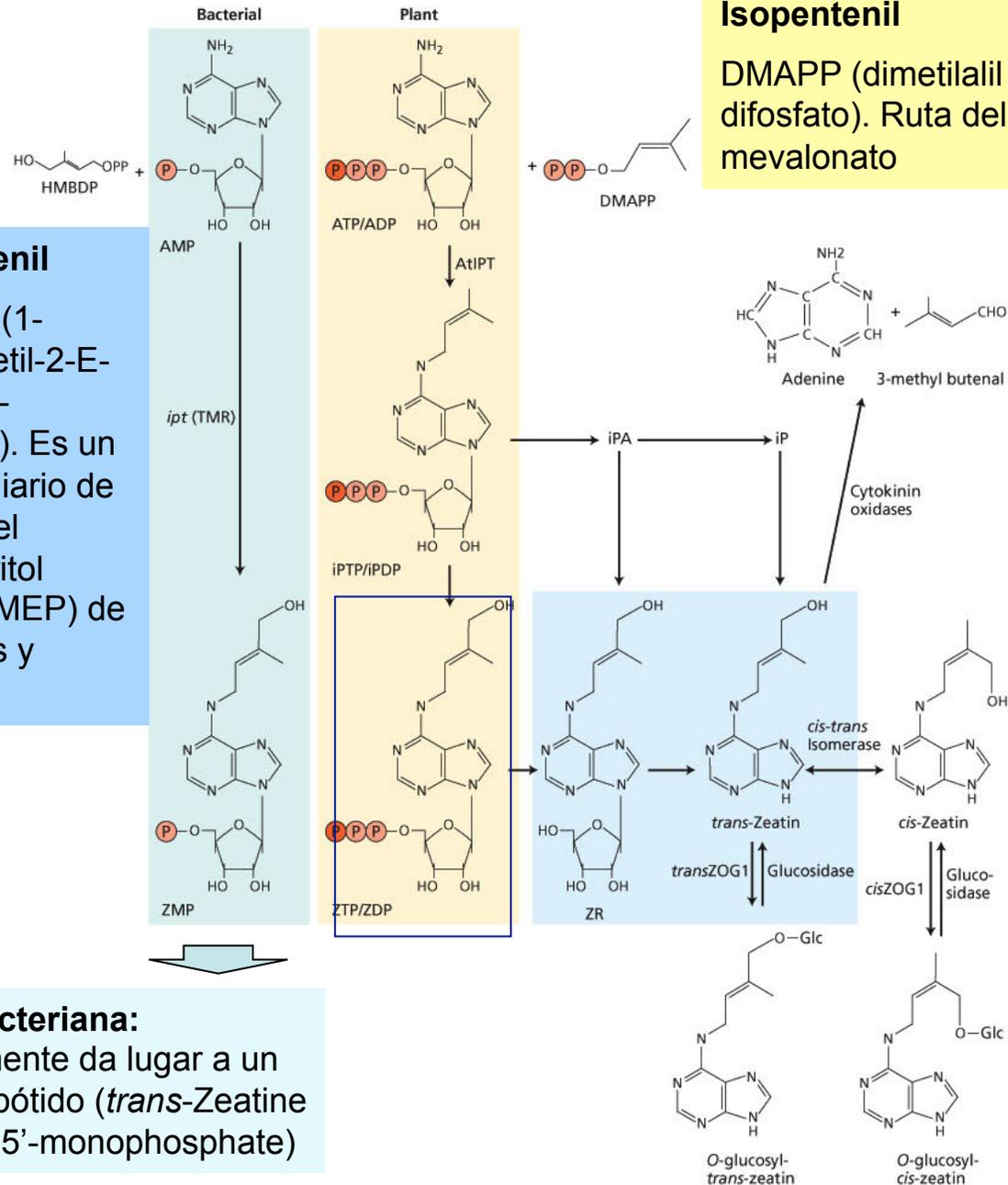
The **TAM** and **IPA** pathways are the primary routes of IAA biosynthesis in plants. The IAN pathway may be limited to 3 families (Brassicaceae, Poaceae, and Musaceae).

The IAM pathway functions in bacteria



Isopentenil
 HMBDP (1-OH-2-metil-2-E-butenil 4-difosfato). Es un intermediario de la ruta del metileritritol fosfato (MEP) de bacterias y plastos

Ruta bacteriana:
 directamente da lugar a un zeatin ribótido (*trans*-Zeatin riboside 5'-monophosphate)



Bacteria el gen *ipt*: codifica una isopentenil transferasa. Sustrato: AMP y HMBDP

Agrobacterium: dos genes *ipt*: *Tmr* y *Tzs*

Plantas: genes *ipt*:
 Sustrato: ADP, ATP y DMAPP

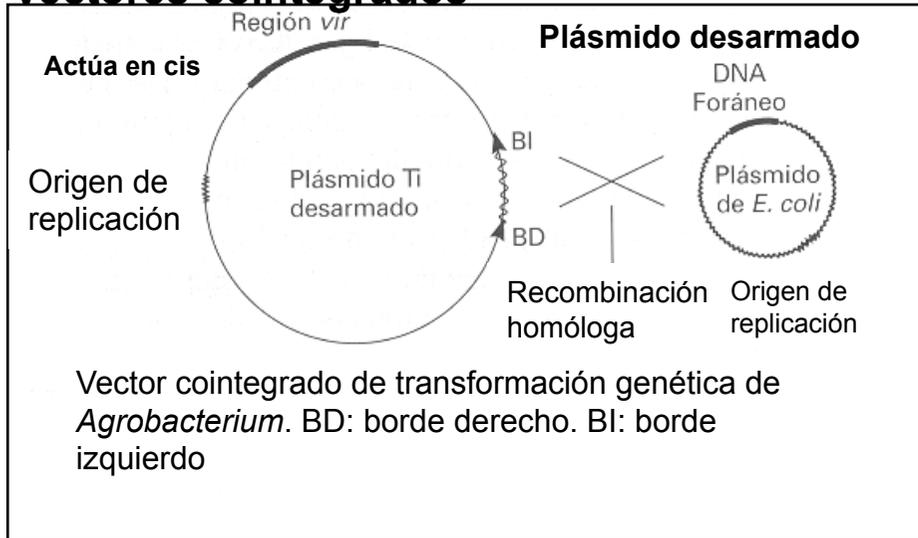
Los productos iPTP/iPDP se convierten en zeatina por un citocromo P450 monoxigenasa

Todas las células infectadas sintetizan CKs, incluso aquellas células vegetales que tienen reprimidos los genes que codifican CKs.

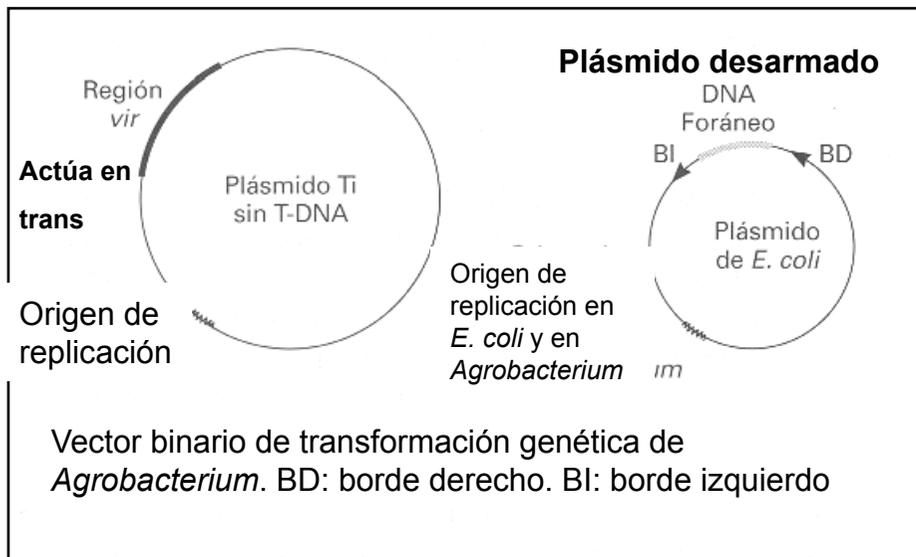


Vectores de *Agrobacterium*

Vectores cointegrados



Vectores binarios



Cointegrados:

- **Plásmido en *E. coli*.** El gen de interés.
- **Plásmido Ti desarmado.** *Agrobacterium*
- **Tras la transformación:** ADN foráneo se integra en el plásmido Ti. Actúa en cis (mismo plásmido)

Binarios:

Region *vir* puede actuar en *trans* respecto al T-DNA.

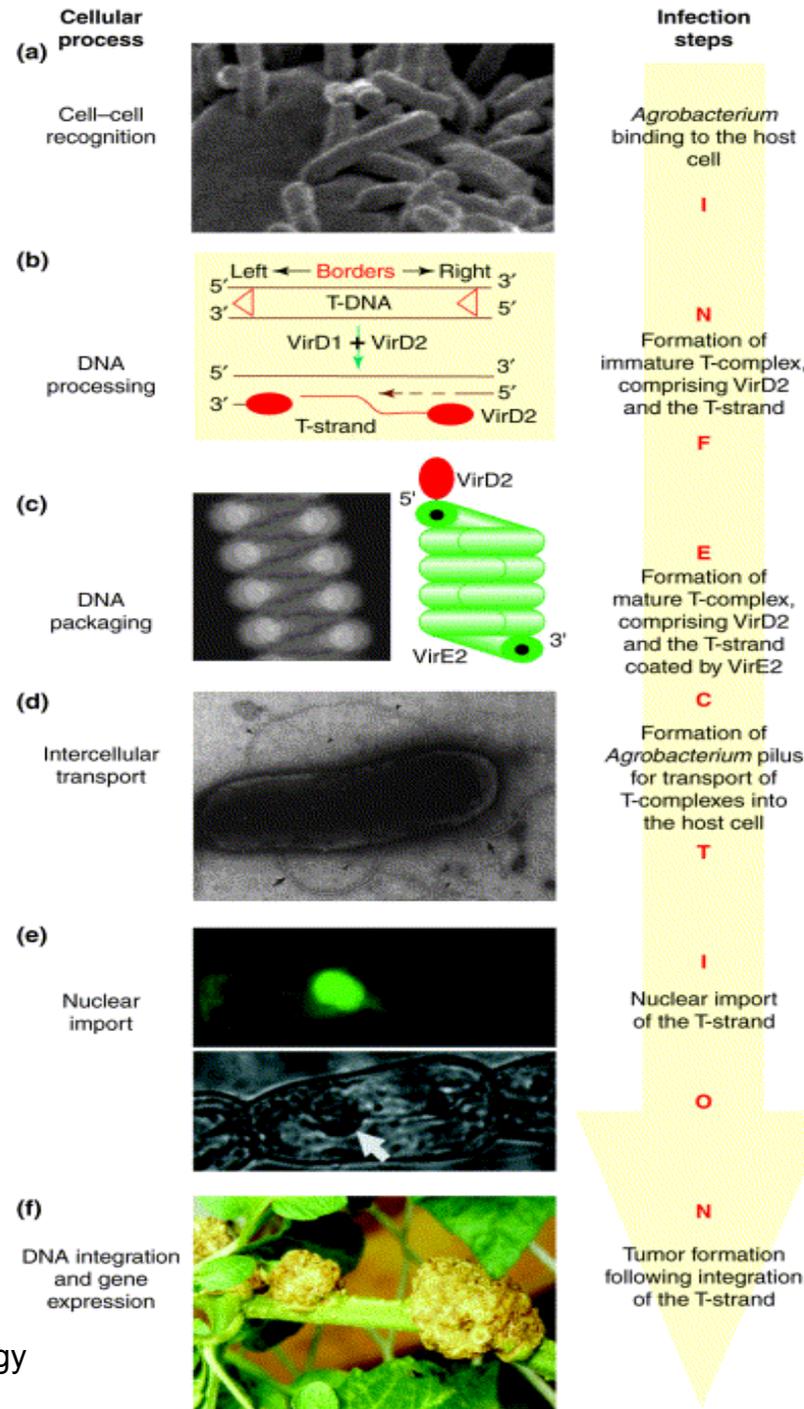
Plásmido Ti: solo región *vir*. Fácil manipulación.

Plantas transformadas con vectores binarios: contienen secuencias de plásmido fuera de la región de T-DNA

REPLANTEAR diseño de vectores



Procesos celulares “afectados” durante la infección *Agrobacterium*



1. Unión *Agrobacterium* a la célula
2. Reconocimiento de moléculas planta por el sensor VirA/VirG
3. Activación genes vir
4. Producción de una hebra de T-DNA
5. Formación del complejo T y transporte a la célula vegetal
6. Transporte al núcleo del complejo T
7. Integración del complejo en el genoma vegetal

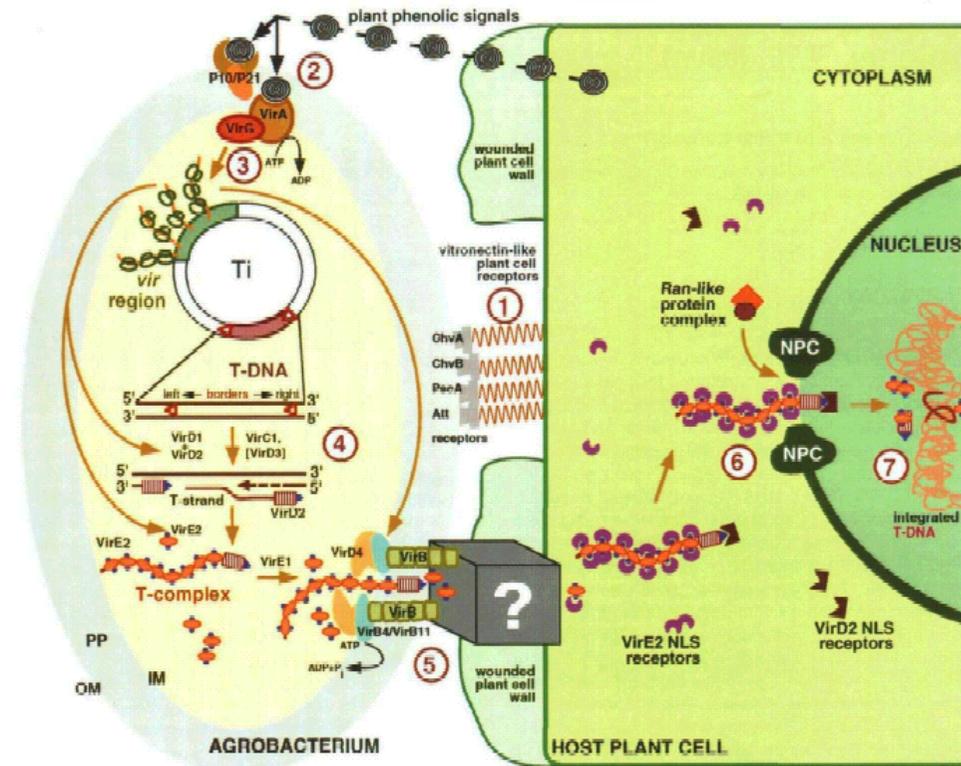


Reconocimiento de señales de la planta por *Agrobacterium*

Proceso celular

Reconocimiento de señales de la planta por *Agrobacterium*

Agrobacterium percibe señales, como compuestos fenólicos y azúcares liberados por las células dañadas. Estos compuestos probablemente forman parte de los mecanismos de defensa de la planta (síntesis de lignina y de fitoalexinas). Estos compuestos “indican” a la bacterias que la célula es competente para la transformación (está dañada)

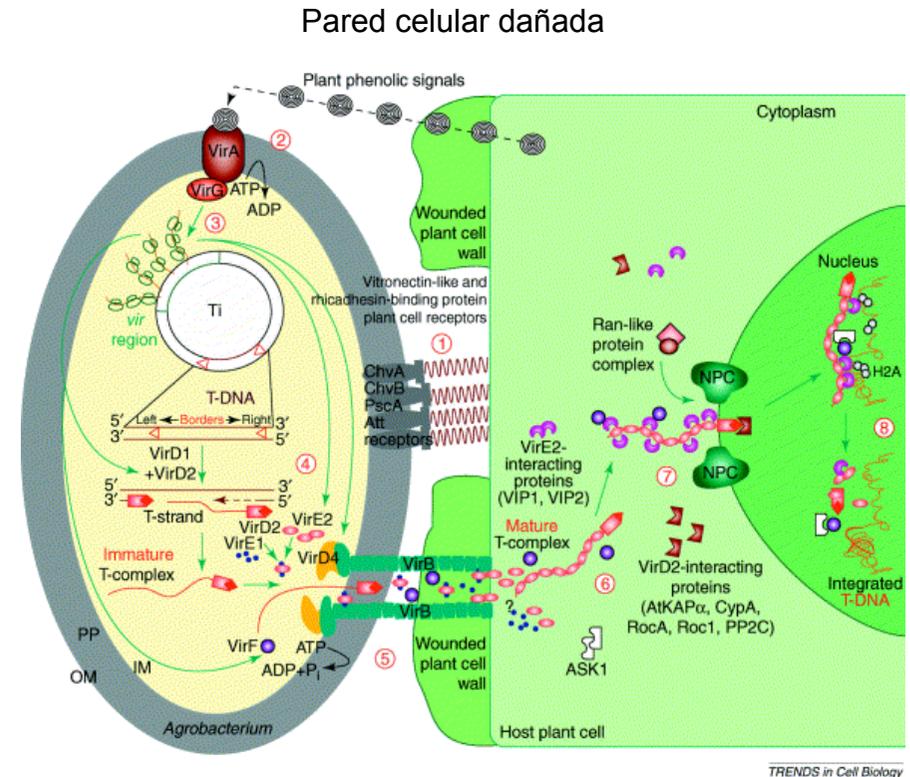


Reconocimiento célula-célula

Infección es necesario una unión entre ambas células

Unión de *Agrobacterium* a célula vegetal (2 etapas):

- Unión inicial mediante un polisacárido (el producto del locus *attR*)
- Seguida de la **producción de una malla de celulosa por la bacteria para reforzar la unión** (mutantes deficientes: la bacteria se “lava”).
- **Unión de la bacteria a receptores** (bajo estudio) de la planta que podrían ser similares a:
 - **vitronectina** (utilizada por patógenos en animales),
 - **rhicadhesin-binding protein** (Proteína dependiente de Ca. Interviene en la unión de *Rhizobium* con leguminosas)
 - **arabinogalactan-protein (AGP)**



Proteínas implicadas:

Chromosomal virulence genes:
ChvA, ChvB, PscA, Att: síntesis, procesamiento, exportación de β -1,2-glucanos cíclicos y otros azúcares

att: required for attachment,



2, 3. Transducción de señal y activación transcripcional de genes *vir*

Bacterias poseen sistemas reguladores de dos componentes (sensor-transducción):

Sensor *VirA* y *VirG*.

Para la **activación de la transcripción de los genes *vir*** hace falta “exudados de plantas”.

Células vegetales dañadas:

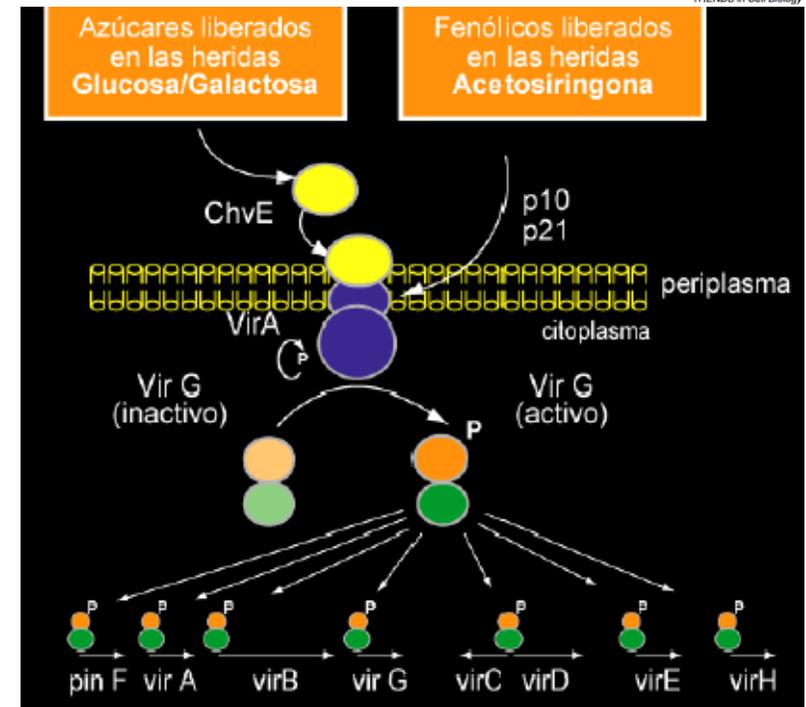
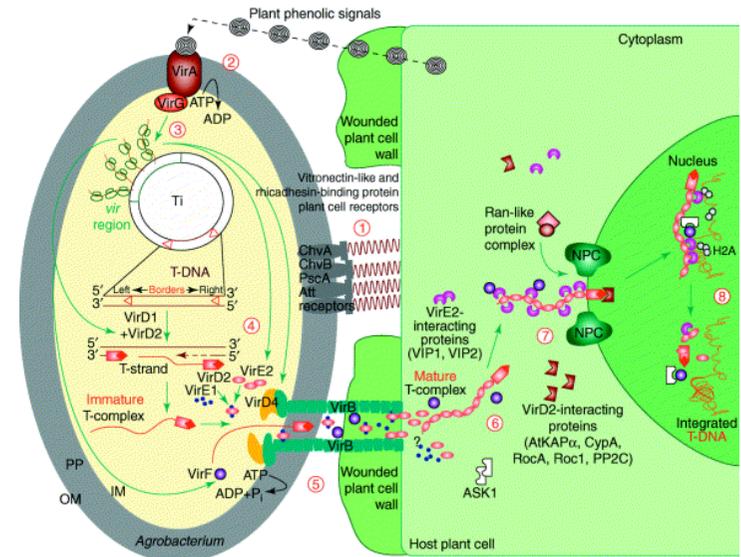
- pH ácido
- flavonoides (acetosiringona)
- azúcares: glucosa, galactosa y xilosa (activan la expresión de los genes *vir*)

Fenoles/azúcares reconocidos por el sensor bacteriano de membrana *VirA*, proteína quinasa de membrana. *VirA* se autofosforila y transfiere el grupo fosfato a *VirG* (dímero estable). La fosforilación del regulador transcripcional *VirG* promueve la expresión de los genes *vir*.

- Compuestos de plantas pueden inhibir la inducción genes *vir*.
 - Ej. maíz: 2-OH-4,7-dimetoxi-benzoxazin-3-ona (MDIBOA)

Proteínas implicadas:

ChvE (transportador glucosa/galactosa que interactúa con *VirA*), ***VirA***, ***VirG***

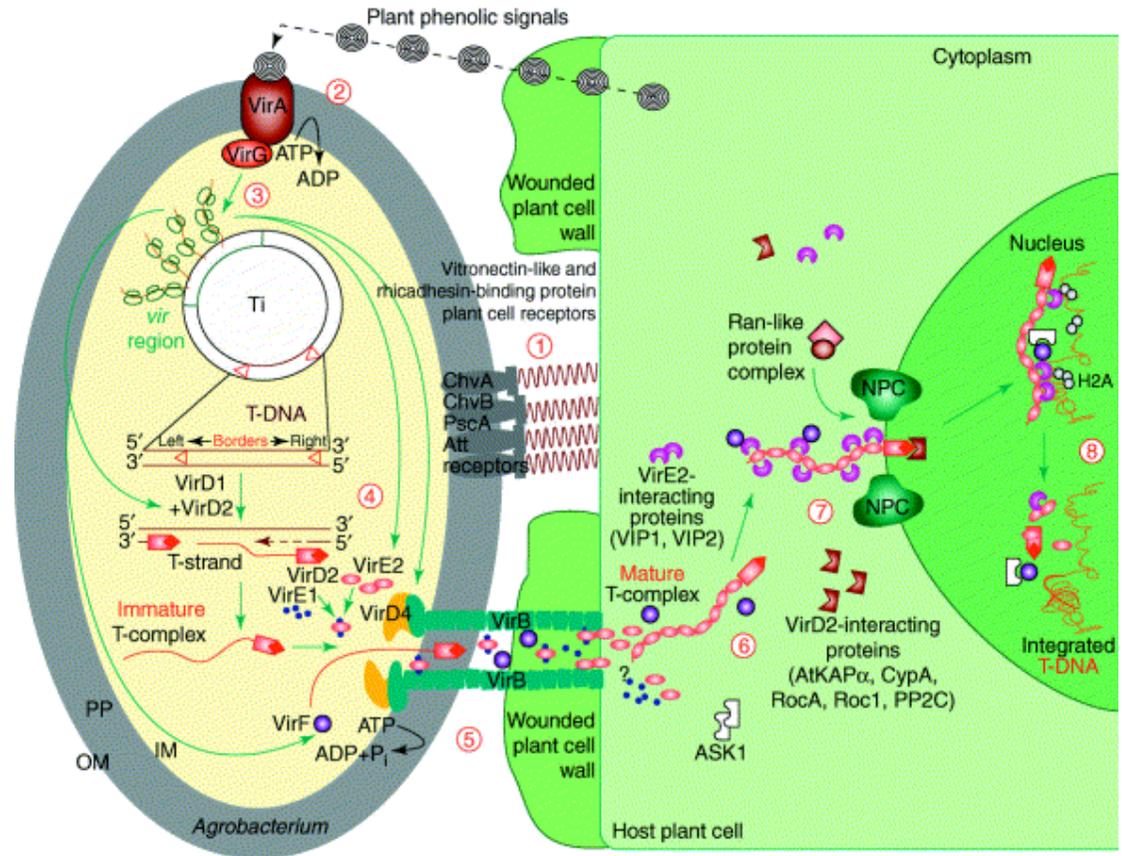


4. Formación de la hebra T-DNA

Inducción de la expresión genes *vir* generan una hebra del T-DNA (ssDNA) que se inicia en RB (necesario para la infección) en dirección 5'→3'

VirD1 y VirD2 actúan como endonucleasas (cortan 3 y 4 bp de bordes). Después del corte, se produce la

Unión covalente VirD2 al extremo 5' de fragmento de T-DNA cortado (guía transporte del T-DNA a la célula). La reparación, mediante nueva síntesis desplaza el fragmento.



TRENDS in Cell Biology



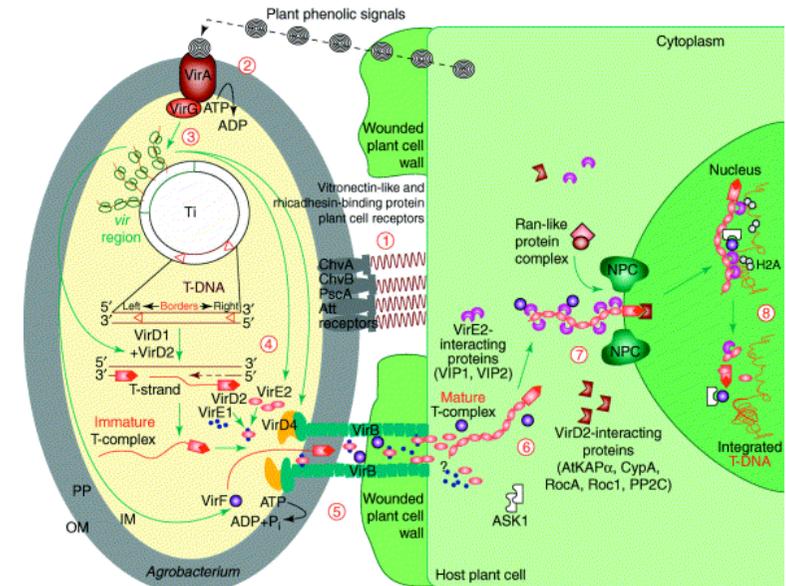
5. Transporte intercelular del T-DNA

Transporte del ADN requiere una vía directa entre ambas células por el sistema de secreción VirB/D4

Formación canal. Codificado por 11 locus del operón *virB*. Proteínas *virB* similares a proteínas *pili* de bacterianas

- VirB1: establece el contacto célula-célula,
- VirB2, 5, 7: componentes estructurales del **pili de *Agrobacterium***. Interactúan directamente con la célula huésped
- VirB4 y VirB11: proporcionan **energía transporte**
- VirD4: **unión complejo T y canal**

Proceso similar a la conjugación bacteriana. Proceso que no parece verse afectado directamente por genes del huésped

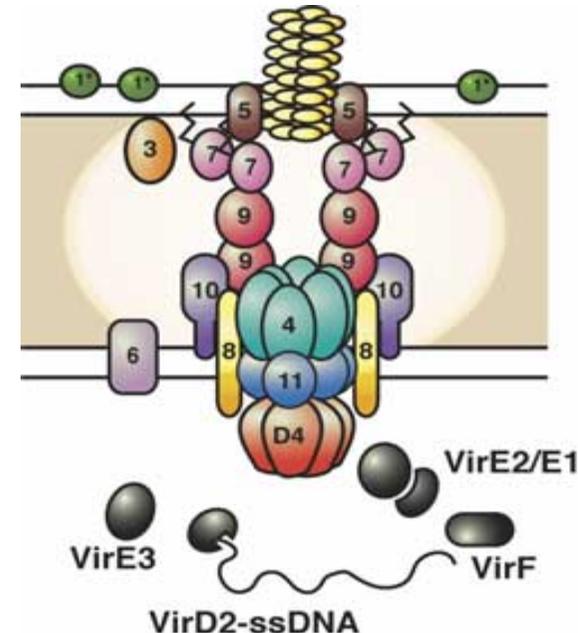


Trends Cell Biol 13:121 (2002)

TRENDS in Cell Biology

Patricia C Zambryski. Plant J 23(2000):11-28

This localization pattern was determined by deconvolution fluorescence microscopy of GFP fusions to T4SS components and substrates. Zupan et al., Plant J



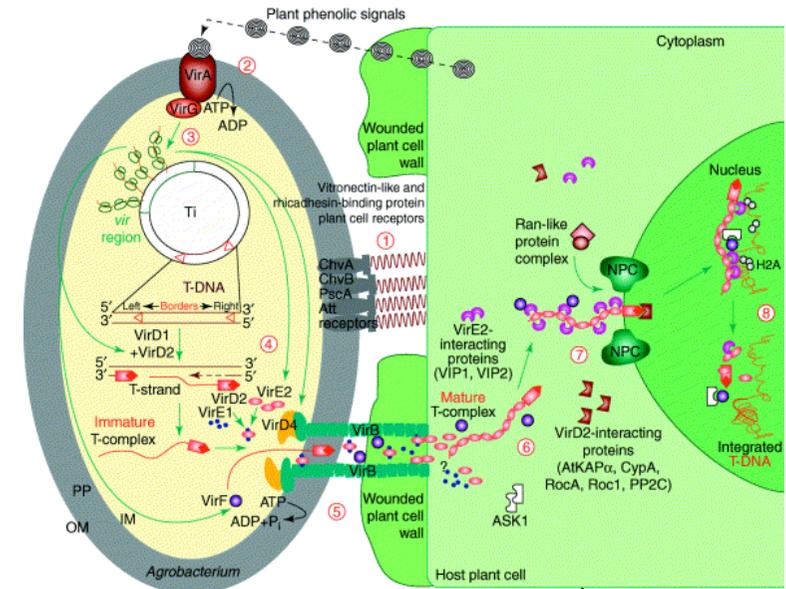
5. Formación del complejo T maduro

Transferencia del complejo T-DNA-VirD2 y proteínas Vir a la célula vegetal

El complejo T-DNA-VirD2 se recubre con la proteína **VirE2**: un filamento cilíndrico hueco, semirígido con una estructura en forma de cola, que se denomina complejo T maduro

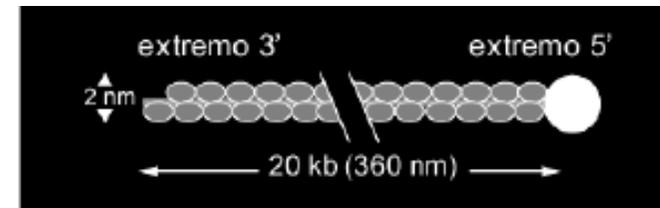
Función proteína VirE2:

- protección frente a nucleasas celulares
- facilita la localización nuclear
 - posee dos señales de localización nuclear
 - la localización nuclear está mediada por otra proteína VIP1 (VirE2-interacting protein 1) que facilita la interacción VirE2 con carioferinas- α (implicadas en el reconocimiento y transporte de proteínas a través de los poros nucleares
- confiere una correcta conformación al complejo T para pasar por los poros nucleares
 - RocA, Roc4, CypA: Chaperonas de la célula vegetal también contribuyen a mantener una correcta conformación de VirD2 en el citoplasma y/o núcleo



Trends Cell Biol 13:121 (2002)

TRENDS in Cell Biology



El **complejo T** está compuesto de una cadena simple de T-DNA cubierta por VirE2. Una única molécula de VirD2 se liga covalentemente al extremo 5' del DNA.

Se estima que se requieren **600** moléculas de VirE2 para recubrir los 20 kbp del DNA-T



Citoplasma celular: gran maraña de elementos del citoesqueleto (restricción movimiento Browniano). Al igual que los virus, el complejo T llega al núcleo con la ayuda del sistema de transporte intracelular del huésped (proteínas motoras, dineína: bajo discusión)

6. Transporte del complejo T al núcleo

<http://multimedia.mcb.harvard.edu/>

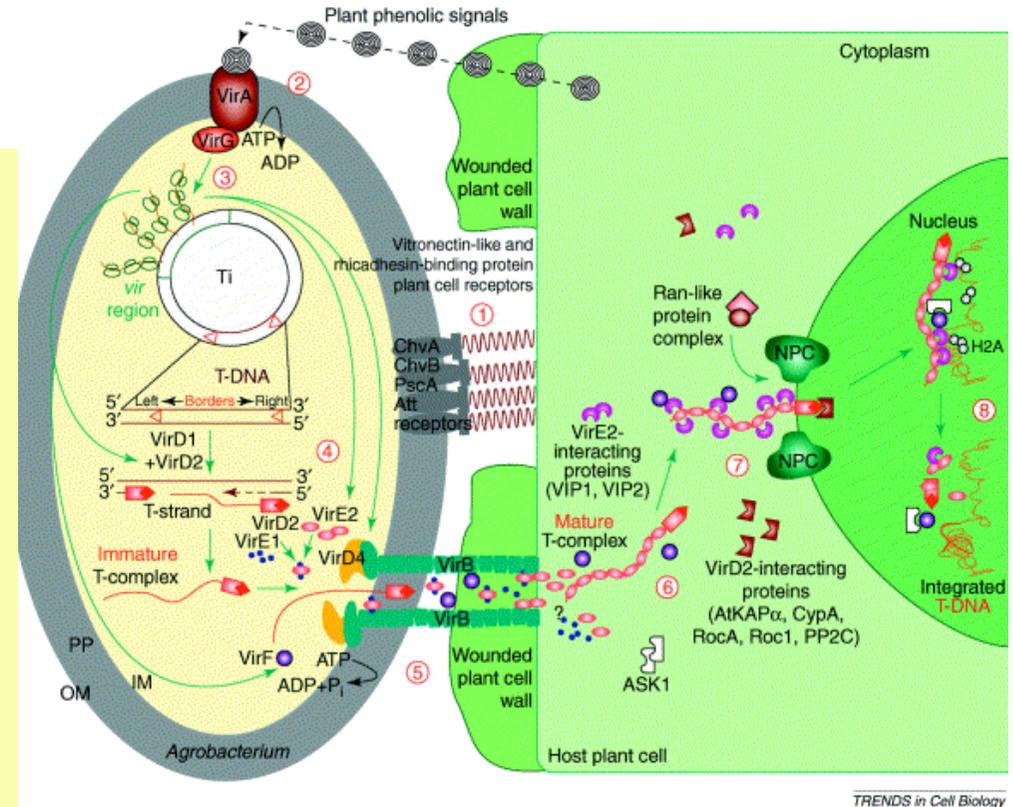
Importación al núcleo (similar a los virus).
Tamaño del complejo T (excede el límite de exclusión por difusión del poro nuclear).
Transporte activo

Transporte activo de moléculas al núcleo requiere señales específicas (NLS)

- VirD2 y VirE2 median el transporte hacia el núcleo (interacción con carioferinas- α)

Interacción con otras proteínas (fosforilasas):
VirD2 Ser/Thr proteín quinasas

- Fosforilación de la región VirD2 NLS \rightarrow mayor actividad facilita su importación al núcleo



En el núcleo:

Complejo T debe integrarse en el genoma (proteínas del huésped):

• “Guiar” al “T-complex” al lugar de integración:

• **ViP1**: interactúa con la histona H2A

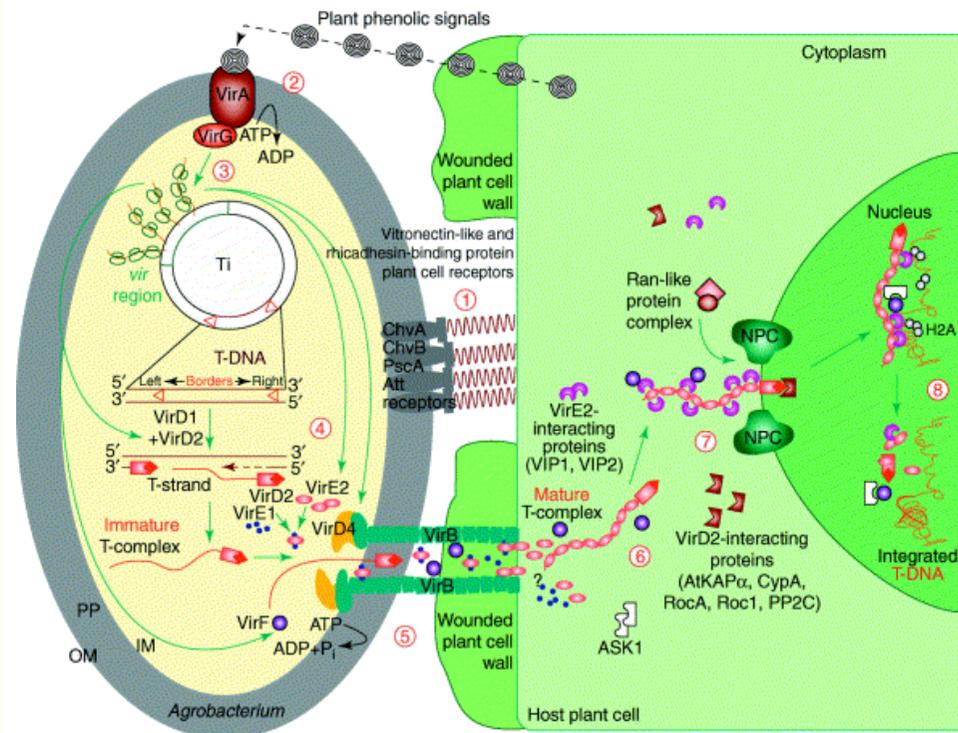
- nucleosoma: 2 unidades de 4 tipos de histonas. H2A, H2B, H3, H4

• Antes de la integración, el complejo T tiene que “despojarse de las proteínas” que lo recubren:

• **VirF** (proteína bacteriana) media la degradación de proteínas en proteosoma.

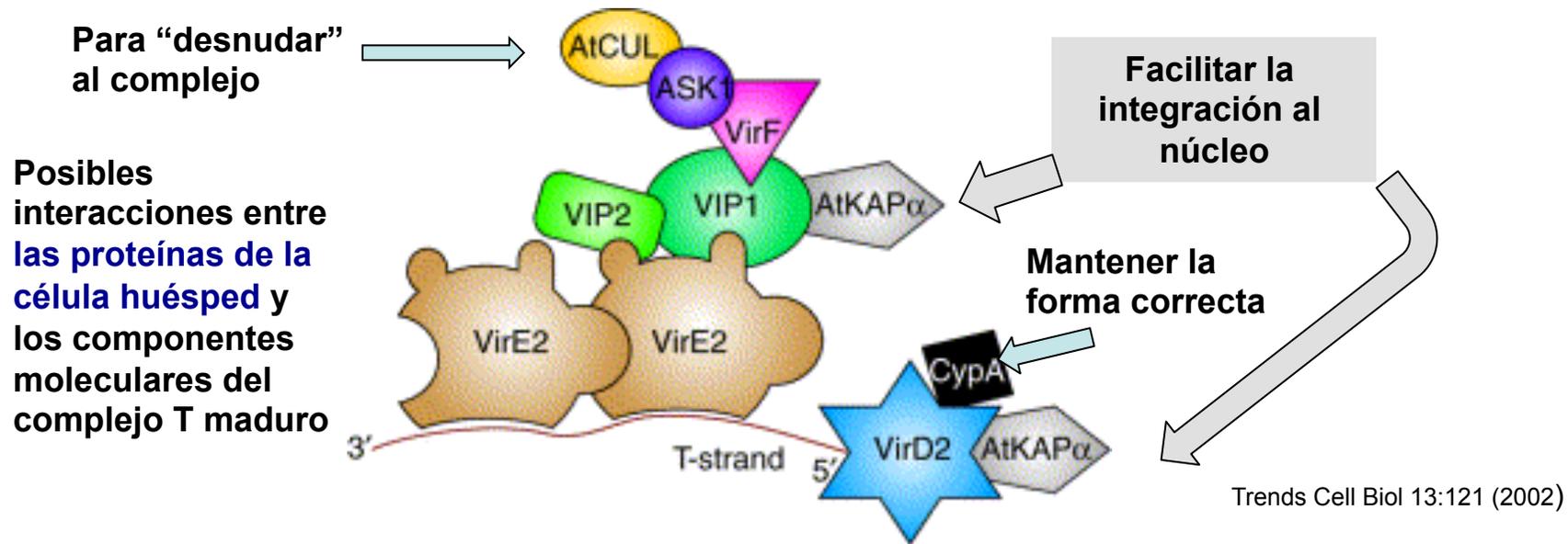
- Reconoce a VIP1

7. Integración del T-DNA



TRENDS in Cell Biology





Interacción del complejo T con proteínas del huésped para:

•Facilitar la integración al núcleo

- Familia de proteínas α carioferinas (implicadas en el transporte citosol-núcleo)
 - VirD2 interactúa de forma directa
 - VirE2 a través de VIP1

•Mantener la forma correcta

- VirD2 se une a la chaperona CypA

•Para “desnudar” al complejo:

- VirF se une a VIP1 y a su vez, VirF se une a los componentes ASK1 y AtCUL: median la degradación proteolítica



7. Integración del T-DNA

En el núcleo. T-complex: despojarse proteínas: interactúan con proteínas del huésped implicadas transcripción (VIP1, CAK2M, TATA-box binding protein) guían al T-complex al lugar de integración.

Integración del T-DNA: recombinación ilegítima. Participan: VirD2 y VirE2

• **VirD2:** fidelidad y eficiencia. No es una ligasa *bonna die* (participación ligasas de plantas)

• **VirE2**

• **Proteínas plantas implicadas:**

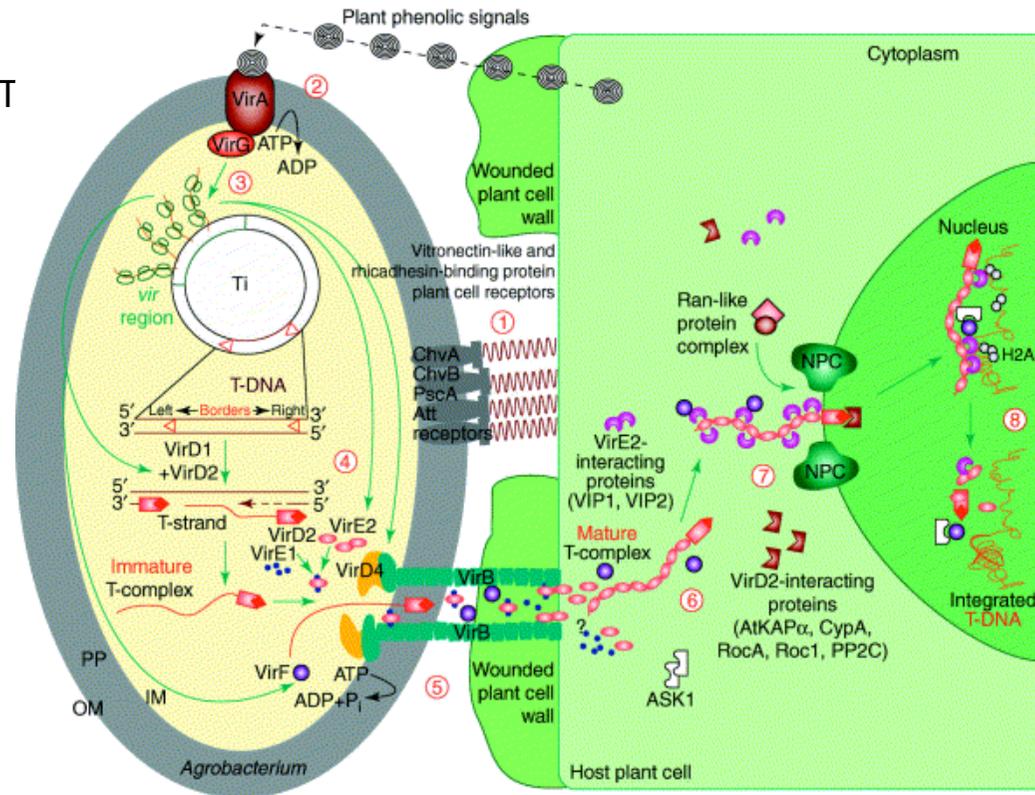
- Transporte del T-complex al punto de integración
- Relajación cromatina
- Corte del DNA planta

Posibles proteínas:

VIP2 (interactúa con proteínas de la cromatina y complejos transcripción).

Mutantes *rat* (resistant to *Agrobacterium* transformation) *Arabidopsis*. *rat5*; histona H2A

Factores de transcripción (codifican enzimas necesarias para la integración)c



TRENDS in Cell Biology

Depende del huésped. Maquinaria de reparación del DNA para convertir ss-T-DNA en ds-T-DNA, reconocer dicho fragmento e incorporarlo en el genoma



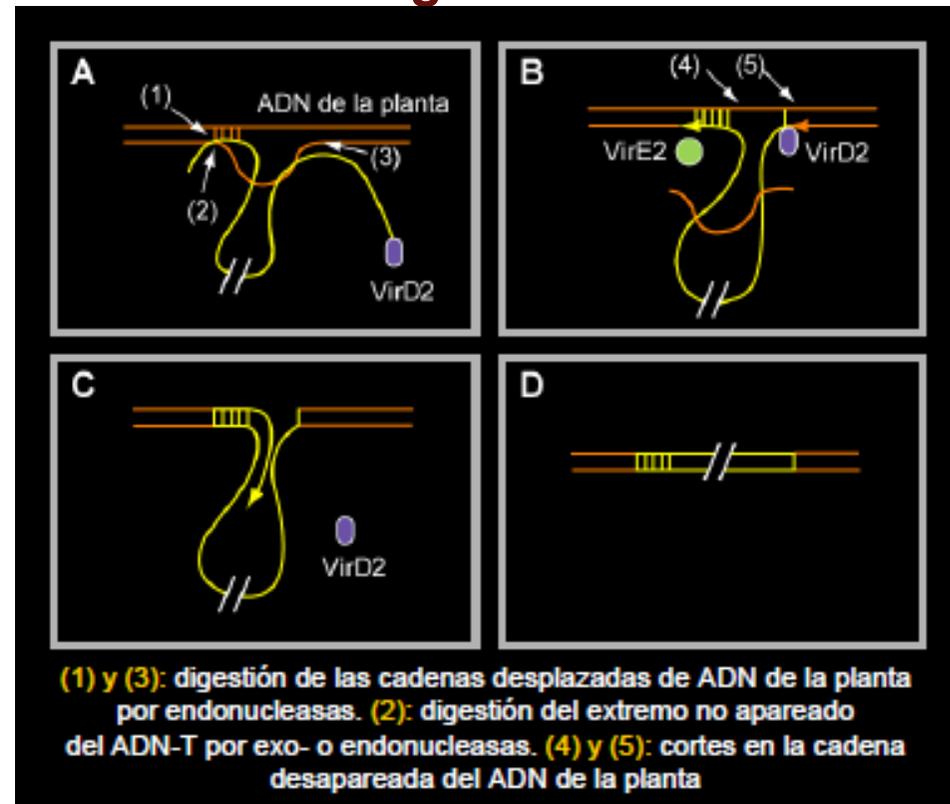
7. Integración del T-DNA

Integración del T-DNA: recombinación ilegítima.

Este proceso, a diferencia de la recombinación homóloga, no requiere de una extensa región de ADN de secuencia complementaria

Proteínas plantas (papel esencial) implicadas:

- Transporte del T-complex al punto de integración
- Relajación cromatina
 - VIP2 (interactúa con proteínas de la cromatina y complejos transcripción).
 - Identificación de otras proteínas: **Mutantes rat (resistant to Agrobacterium transformation)**
Arabidopsis. rat5; histona H2A
- Corte del DNA planta
- Enzimas implicadas en la maquinaria de reparación del ADN



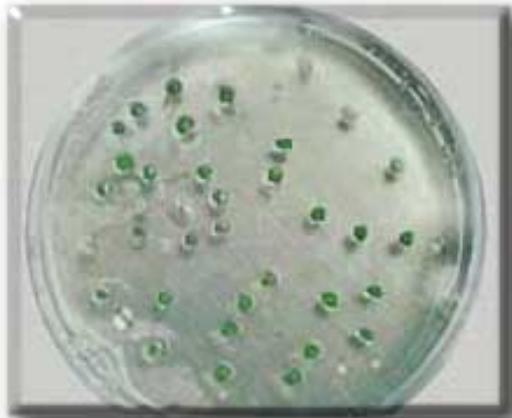
Depende de proteínas del huésped. También participan **VirD2** y **VirE2**

La integración del T-ADN al genoma de la célula vegetal involucra el apareamiento no homólogo entre éste y el DNA cromosómico

Maquinaria de reparación del ADN para convertir ss-T-DNA en ds-T-ADN, reconocer dicho fragmento e incorporarlo en el genoma



Protocolo estándar para la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*



GERMINACIÓN

Esterilización de las semillas de tomate.
Siembra en placas Petri (o cajas Magenta)
en medio MS. 25°C, 16h luz:8h oscuridad.



OBTENCIÓN DE EXPLANTOS

7 días de cultivo. Obtención de explantos a
partir de los cotiledones de las plántulas de
tomate.



CORTE DE EXPLANTOS

Los cotiledones de las plántulas se cortan y se sumergen en medio MS líquido con 2,4-D. Las heridas facilitan la entrada de *Agrobacterium*



PASOS PREVIOS ANTES DE LA INCUBACIÓN

Los explantos se cultivan en medio MS suplementado con vitaminas, zeatina y auxina (toda la noche)

Cultivo de *Agrobacterium* el medio líquido con antibióticos en oscuridad a 29°C.

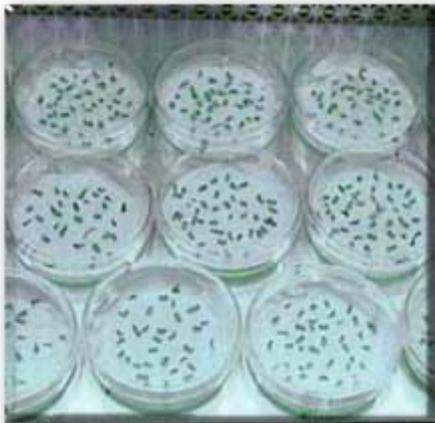
INCUBACIÓN CON AGROBACTERIUM. Medio líquido

Cultivo de *Agrobacterium* hasta DO600= 0.2-0.3.

Incubación de los explantos con el cultivo de *Agrobacterium*. Tiempo de incubación depende de la concentración de bacterias.

EXCESO DE AGROBACTERIUM

El exceso de *Agrobacterium* se elimina de los explantos con papel de filtro. Con ello se evita el crecimiento excesivo de la bacteria durante el periodo de co-cultivo



TRANSFERENCIA DE ADN-Cocultivo (2 d)

Los explantos se co-cultivan con *Agrobacterium* durante 48 h, tiempo suficiente para permitir la transferencia de ADN a las células dañadas





REGENERATION PLANTA DE TOMATE

Los explantos se colocan en un medio que contiene antibióticos para llevar a cabo la selección y control de *Agrobacterium*. El medio contiene hormonas y antibióticos: kanamicina y carbenicilina (500mg/L). Formación inicial de un callo en el explanto en el lugar de corte como consecuencia de la adición de zeatín ribósido.

Tiempo: 3 semanas



APARICIÓN DE VÁSTAGOS

Después de 6 semanas, se aíslan los callos de los explantos. A continuación, tiene lugar la formación de los vástagos y se transfieren a medio MSZ, con altos niveles de citoquinina (zeatín ribósido).

MEDIO DE ENRAIZAMIENTO

Los vástagos formados se trasladan al medio de enraizamiento. Este medio carece de zeatina, contiene kanamicina para seleccionar los transformados.

Duración: 9 semanas



PLANTAS TRANSGÉNICAS

Plantas transgénicas completamente formadas. **Tiempo: 11 semanas**

SELECCIÓN Y ANÁLISIS DE PLANTAS TRANSFORMADAS

- Resistencia a la kanamicina
- Presencia de la actividad GUS
- Presencia del T-DNA (gen de interés) mediante Southern blot
- Análisis de la descendencia





ACLIMATACIÓN. TRANSFERENCIA AL SUELO

Plántulas se transfieren a contenedores con sustrato (vermiculita/turba)

Aclimatación progresiva

Proceso de aclimatación: 2 semanas

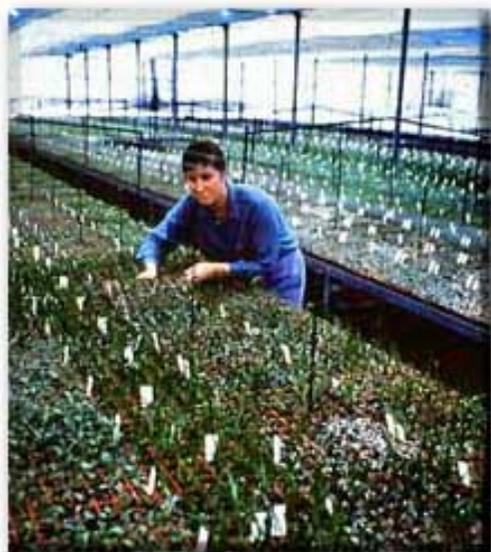
Tiempo: 13 semanas



PASO AL INVERNADERO

Las plantas se transfieren al invernadero. Dos cultivares transgénicos; Moneymaker (izquierda), y Motelle (derecha).

Tiempo: 15 semanas

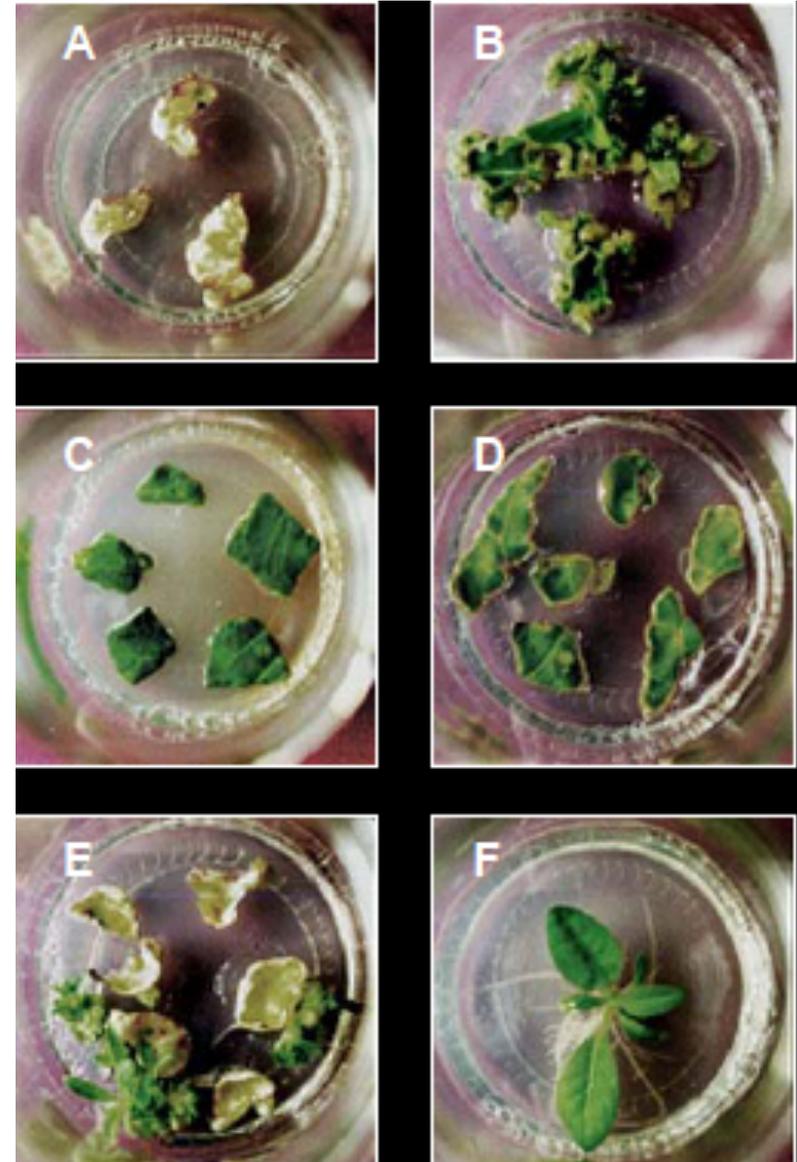


UN INVERNADERO DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

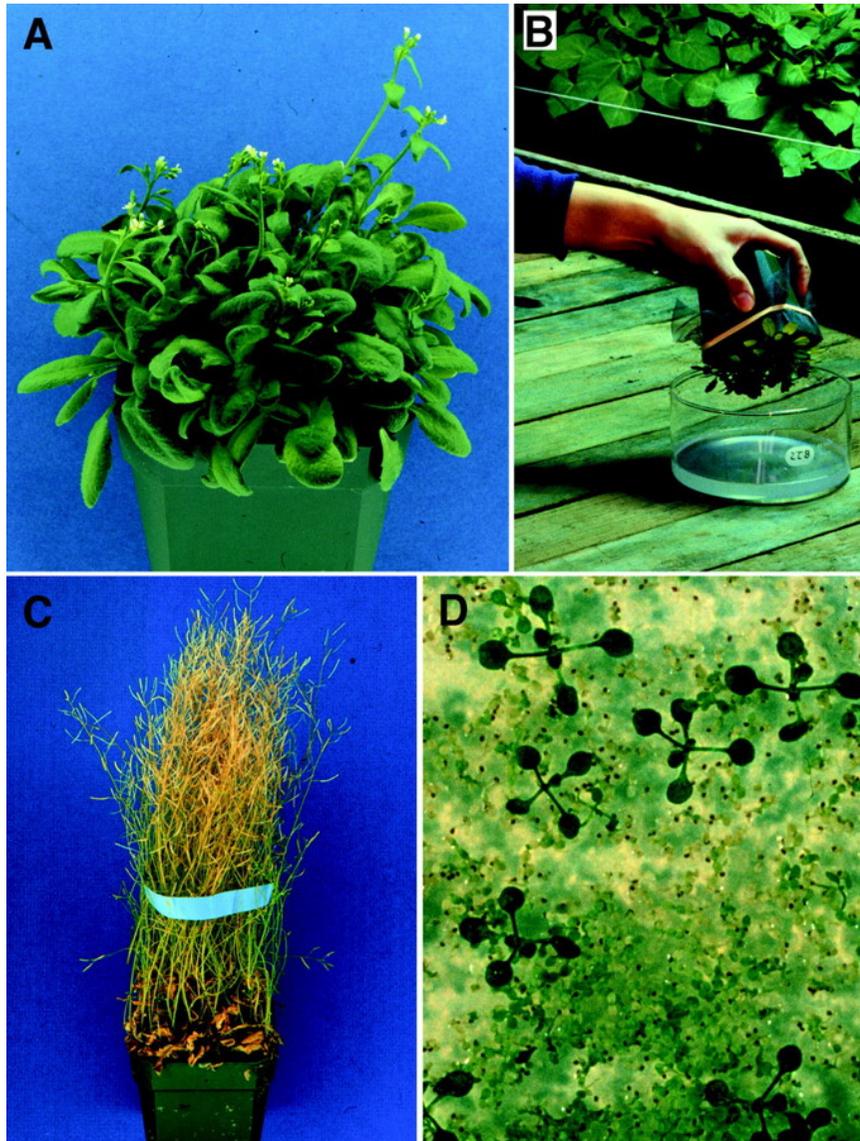
Control del crecimiento y seguimiento exhaustivos (**utilización confinada**)



Discos de tabaco



Floral dip: Transformación de inflorescencias



Ventajas:

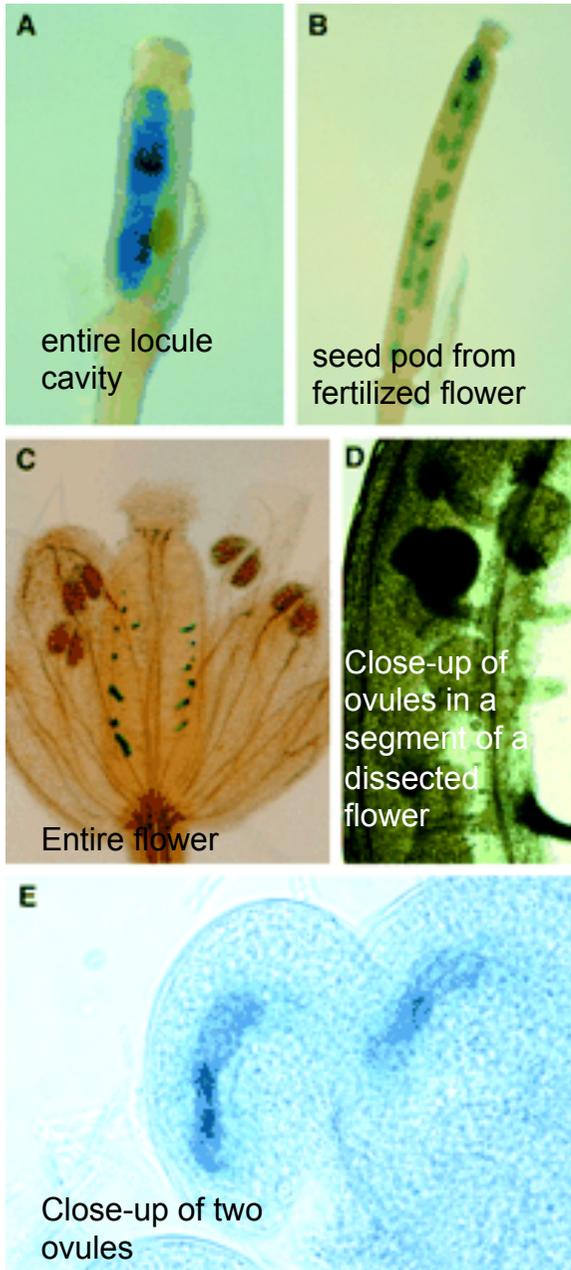
- Obviar la fase de regeneración y el cultivo *in vitro*
- Obtención de gran número de transformantes (>3%)
- Protocolo sencillo y reproducible



Protocolo de transformation mediante “*Floral dip*”

- **Cultivo de plantas de *Arabidopsis* hasta la floración (buen riego)**
- **Preparación de *Agrobacterium* portando el gen de interés en un vector binario. Hacer un gran cultivo 29°C en presencia de antibióticos hasta la fase exponencial**
 - Centrifugar el cultivo. Lavar las células y resuspender hasta DO600= 0.8
 - Para facilitar el contacto se añade surfactante (0.05%)
- **Sumergir la parte superior de la planta en la solución de *Agrobacterium* 2-3 segundos**
 - Este proceso puede repetirse 2 ó 3 veces:
 - a los dos días y otro
 - una semana después
- **Cubrir las plantas 16-24 h para mantener una elevada humedad relativa**
- **Cultivo de plantas hasta la obtención de semillas**
- **Selección semillas transformadas incubándolas en el medio de selección**





Transformación mediante floral dip

Tejido diana: óvulos

Marcador GUS se observa tinción en óvulos de flores adultas y jóvenes (sin polinizar)

No se observa tinción en anteras ni polen

Plantas transformadas mediante el método del floral dip

Arabidopsis thaliana

Infiltración a vacío: Bechtold & Ellis 1993

Floral dip. *Transformación (%)* 0.06-2.6% (Desfeux et al. 2000. *Plant Physiol.* 123:895)

Medicago truncatula

Infiltración a vacío inflorescencias. *Transformación (%)* 4.7-76 (Trieu et al. 2000. *Plant J* 22:531)

Infiltración a vacío plántulas. *Transformación (%)* 2.9-27.6%

Brassica campestris



Agrobacterium rhizogenes

Plásmido Ri (root-inducing)

- T-DNA
- Genes *rol*:
 - *rolB*, *rolC* (sensibilizan los tejidos a las auxinas)
- Región vir

Vectores de *A. rhizogenes* utilizados en transformación

- Plásmido Ri sin desarmar
- Vectores MAT tipo rol

Inconvenientes

- Gama de huéspedes limitada
- Fenotipos aberrantes parte aérea
 - hojas muy arrugadas
 - pérdida de dominancia apical
 - reducción distancia entre entrenudos
 - geotropismo radicular reducido
 - hiperestilo (flor)



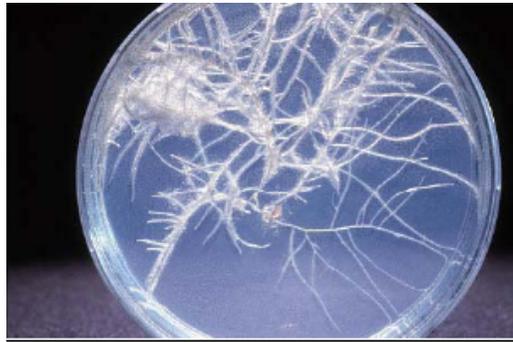
Tumor de raíces producido por *Agrobacterium rhizogenes* en discos de remolacha

doi: 10.1101/gad.2.6.688
Genes & Dev. 1988. 2:
688-697



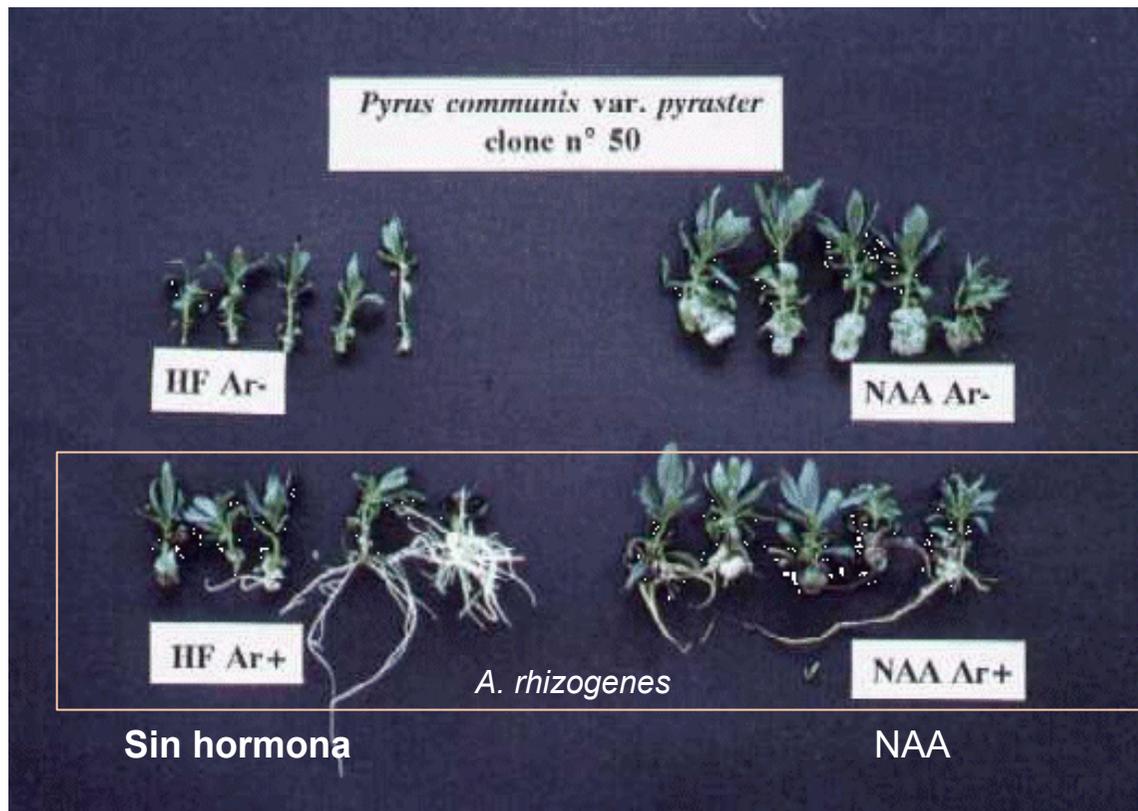
Fenotipo Ri en plantas de *Brassica napus*





Cultivo de raíces de tabaco

Transformación con *Agrobacterium rhizogenes*



Peral silvestre, clon P50

HF = hormone free medium;
 NAA = medium supplemented with NAA 0.5 mg/l;
 Ar- = microcuttings not infected;
 Ar+ = microcuttings infected with *A. rhizogenes*



Búsqueda de organismos alternativos a Agrobacterium spp.

Complejo escenario: patentes y derechos de propiedad intelectual

Grupo CAMBIA (Charles Sturt University Australia)

Bacterias no patógenas: simbioses o benignas endo(interior)/
epífitas(superficie) de las plantas
Amplia gama de huéspedes

Gram-negativa,
fijadoras de N₂

Estudios iniciales: *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti*,
Mesorhizobium loti

Métodos de transformación: Requieren optimización

Sistema de licencia abiertos: Biological Innovation for Open Society
(www.bioforge.net, www.bios.net)



Transferencia de genes mediante vectores virales

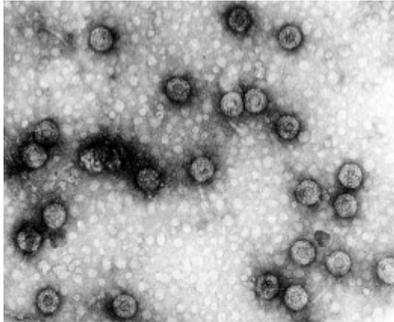
Ventajas

- **Transferencia de genes:** Alta eficiencia
 - infección y amplificación del transgén ocurre a través del proceso de replicación del genoma viral
 - **Replicación:** no integrativo (Vectores basados T-DNA de Agro: integrativos)
 - Dispersión sistémica y elevado número de copias
 - **Diseño de vectores virales** (ADN y ARN): **Conocimiento del genoma viral**
 - Amplio rango de huéspedes, virulentos, transmisión fácil
 - Poder “llevar” genes adicionales sin afectar el proceso de empaquetamiento y de infección
- **Grupos de virus estudiados para el desarrollo de vectores virales**
 - ADN: Caulimovirus. Geminivirus
 - ARN:
 - Fáciles de manejar
 - mayores niveles de expresión
 - pocos genes, altos niveles de expresión
 - elevada capacidad infectiva
 - Vector: reemplazar proteína cápsida

ejemplos de
ingeniería genética
naturales



Caulimovirus



Virus de ADN doble cadena
(facilita la manipulación)

Grupo caulimovirus :

- 6–19 virus,
- grupo de huéspedes limitado

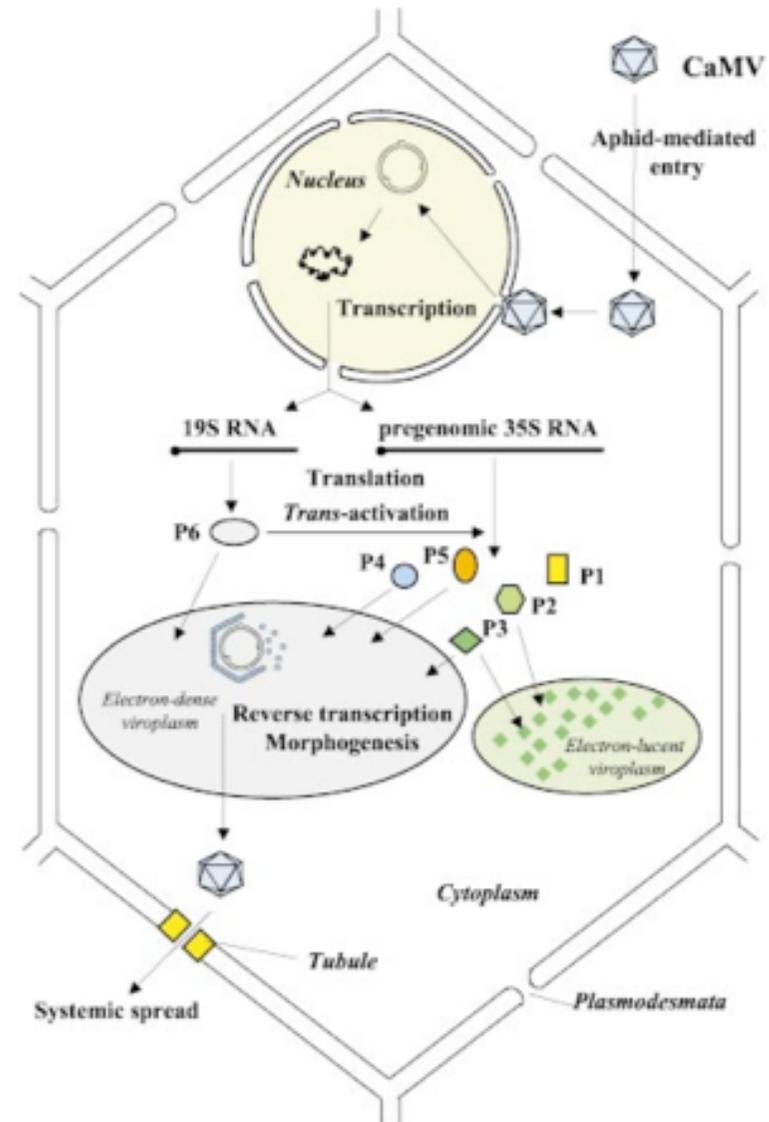
Cauliflower mosaic virus (CaMV)

Transmisión: áfidos, también mecánica

Nº viriones/célula: alto $> 10^6$,

Dispersión: 3-4 semanas toda la planta

Localización: cuerpos de inclusión en citosol (matriz proteica embebidas las partículas virales)



Caulimovirus

Estructura genómica

- Molécula circular: 8 kb
- Tramos de lectura abierta (open reading frames, ORF): 6 ORF principales y dos secundarios

Vectores.

- Región **ORF II** (factor de transmisión por áfidos) y **ORF VII** (función desconocida) **se reemplazan por el gen de interés**
- **No se ha descrito integración del transgén** usando CaMV

Ejemplos:

Brisson et al (1984) Nature 310:511
expresión gen bacteriano –dihidrofolato reductasa- en células de nabo. Sustitución: ORF II



Western blot con anticuerpos DHFR

- A, no infectada
- B, infectada sólo con el vector
- C, infectada con vector y dhjfr
- D, infectada con
- E, 100 ng proteína DHFR recombinante purificada

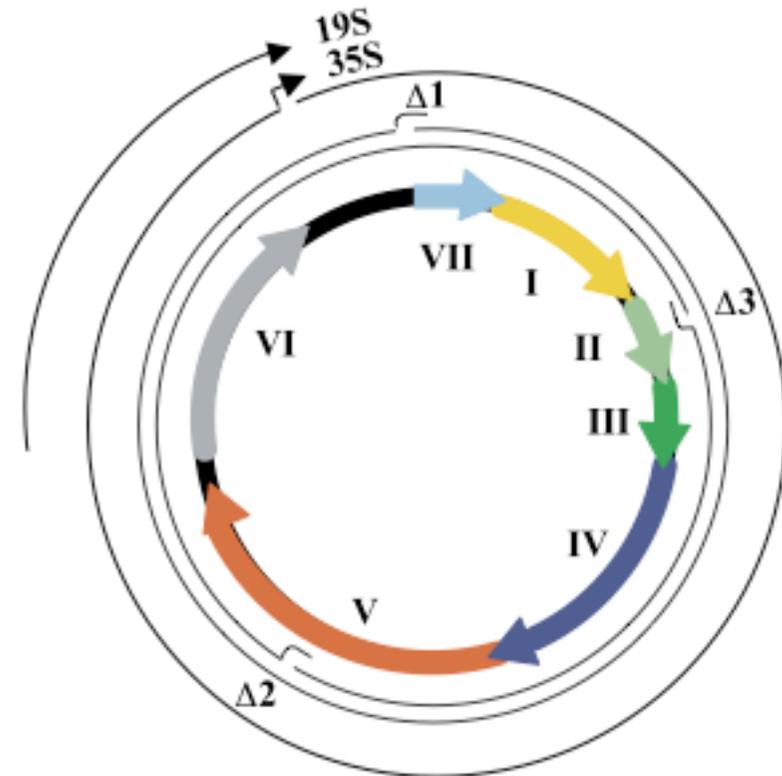
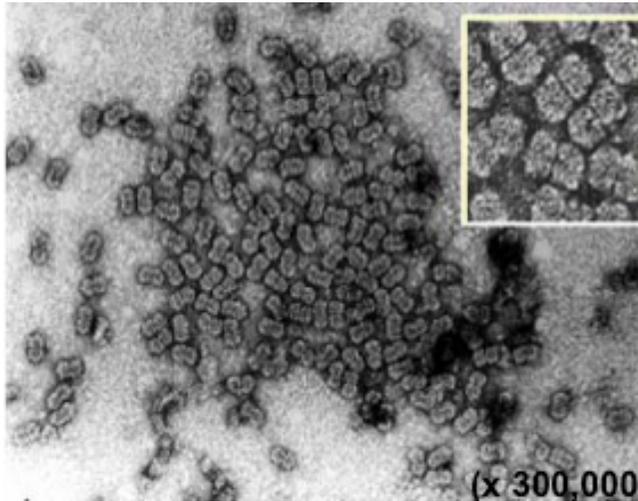


Fig. 2 Schematic diagram of the CaMV genome. Thin lines represent the double-stranded circular DNA (8 kbp) with sequence discontinuities ($\Delta 1-3$). Major ORFs shown by coloured arrows code for the cell-to-cell movement protein (I), aphid transmission factors (II and III), the precursor of the capsid proteins (IV), the precursor of aspartic proteinase, reverse transcriptase and RNase H (V), and an inclusion body protein/translational transactivator (VI). The solid black lines of the inner circle are the long and small intergenic regions which contain the 35S and 19S promoters, respectively. The two external arrowed lines correspond to the 35S and 19S RNAs.

Geminivirus



Geminivirus: características

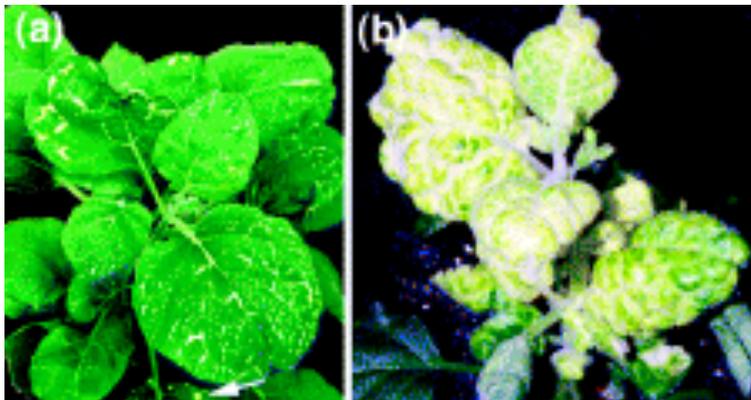
- Genoma circular de ADN monocatenario (1-2 moléculas)
- 2,6-3,0 kb longitud
- Conversión a ADN bicatenario: núcleo célula vegetal
- Acumulación: núcleo

Vector viral:

Reemplazar proteína cápsida

Desventajas.

No transferencia mecánica (por insectos)



Silenciamiento génico de genes de plantas usando secuencias homólogas de tamaño < 100 bp

Ejemplo

Clorosis: vector basado virus TGMV (tomato golden mosaic virus) gen *su* que codifica una subunidad de enzima del cloroplasto Mg quelatasa

The Plant Journal

[Volume 27, Issue 4](#), pages 357–366, 2001





Biolística: transferencia de genes mediante disparo de microproyectiles a alta velocidad



Pistola génica Helios

BioRad PDS-1000 He System (PARTICLE DELIVERY SYSTEM)

- **Método peculiar de transformación desarrollado para transformar monocotiledóneas** (cereales, maíz Bt)
- Transferencia de genes:
 - núcleo
 - plastos
 - Herencia materna, en general. No riesgo de transferencia a otras especies
 - Alto número de copias no silenciamiento génico
 - 100 cloroplastos/célula. Cada cloroplasto 100 copias del gen
- **Pequeñas partículas recubiertas de DNA**
 - Aceleración de micropartículas:
 - Explosión química de pólvora seca
 - Descarga eléctrica
 - Descarga de aire, CO₂ o N₂ comprimido, He a alta presión
 - Flujo de helio con cañón de precisión

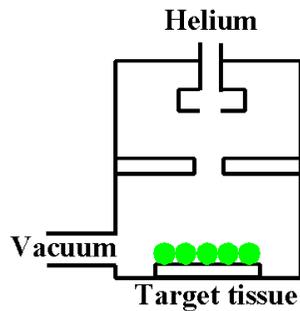


1987. Stanford et al. (Universidad Cornell) describen la técnica de bombardeo de micropartículas para la transferencia directa de ADN. Aceleración pólvora y partículas de tungsteno. introdujeron el gen CAT(chloremphenicol acetyl transferase) en células epidérmicas de cebolla

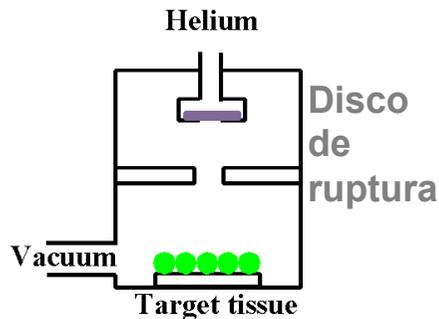


PRINCIPIOS DEL APARATO DE BIOLÍSTICA

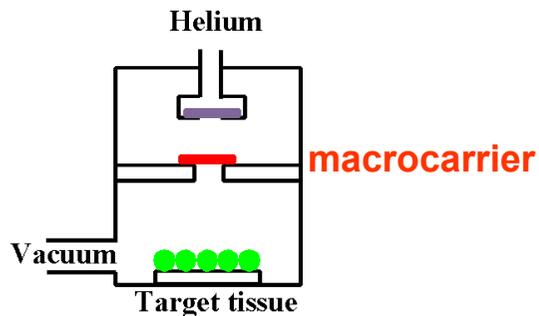
ETAPA 1



ETAPA 2



ETAPA 3



El sistema dispone de una **bomba de vacío** en la parte inferior de la cámara y de una **fuerza de presión**: un tanque de He

Se coloca un **disco de plástico** cerca de la salida del gas.

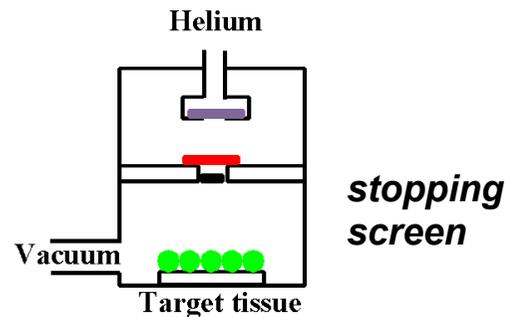
El grosor del disco determina la presión necesaria de gas (Ej. 1100 psi o 7,58 MPa) para acelerar las partículas

psi, Pounds per Square Inch: 1 *psi* = 6894.76 Pa)

Se coloca debajo del disco de ruptura un disco de plástico, macrocarrier, con partículas de oro o wolframio recubiertas de ADN (vector: plásmido con gen de interés y genes marcadores e informadores)

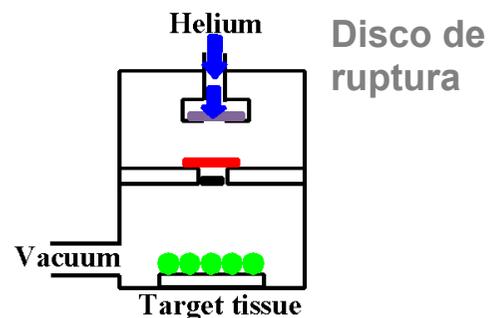


ETAPA 4



Se coloca un disco perforado (stopping screen/plate) para retener el disco de ruptura pero que permite el paso de los microproyectiles. La distancia entre el “stopping screen” y el tejido puede variar

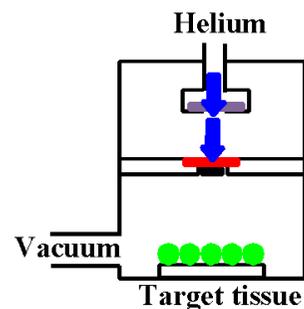
ETAPA 5



Hacer vacío con ayuda de la bomba.

Abrir el tanque de gas. La presencia del disco de ruptura impide la salida de gas, la presión va creciendo hasta que alcanza la presión límite. La presión de rotura se puede seleccionar

ETAPA 6



Cuando se alcanza la **presión límite se rompe el disco de ruptura** y el He entra en la cámara y **acelera al macrocarrier** compuesto por **partículas recubiertas de ADN**. Los **projectiles** alcanzan velocidades de varios **cientos de metros por segundo**, lo que les permite atravesar la pared celular y las membranas. **El vacío permite amortiguar y dispersar la onda de choque de helio.**



Biolística. Optimización: 3 aspectos

■ Tipo y preparación de las micropartículas

- Naturaleza, preparación, adherencia y concentración de ADN
 - poco ADN: baja frecuencia de transformación
 - mucho ADN:
 - número de copias elevado,
 - riesgo de reagrupamientos
- Número y tamaño
- Naturaleza físico-química

■ Aceleración de las partículas

- Vacío y distancia de bombardeo
- Diámetro de apertura de la placa de retención

■ Tejido o células diana

- Tipo y capacidad de regeneración *in vitro* de los explantos
- Preparación y condiciones de cultivo de los explantos pre- y post-bombardeo
- Requerimiento de temperatura, fotoperiodo y humedad de la planta donante de explantos y del tejido bombardeado

Proceso de transferencia del ADN (2 etapas):

Fase de preintegración: Moléculas de vector se unen (fragmentos que contienen múltiples copias del gen)

Fase de integración: integración en un simple locus → puntos calientes de integración. También ocurre con el uso del promotor 35S CaMV y vectores binarios de *Agrobacterium*



Expresión transitoria del gen chivato *uidA* en embriones bombardeados con diferentes dosis de micropartículas

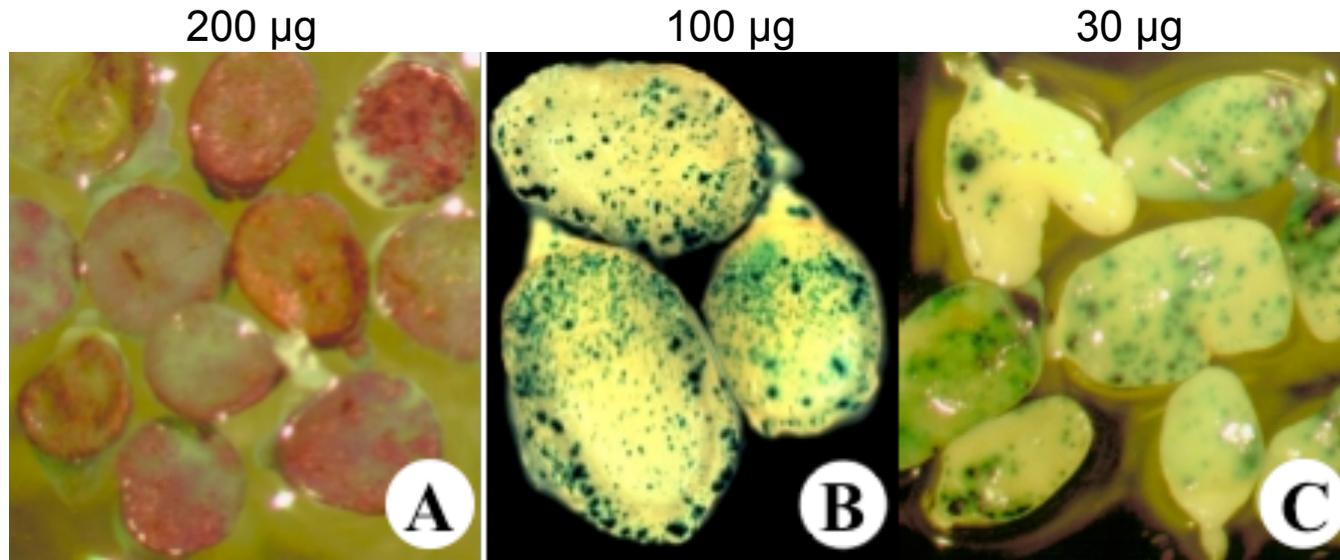


Figure 5: Transient GUS expression of immature rye embryos bombardment with different micro-particles amount, coated with the pHc25 GUS expression vector (Christensen and Quail, 1996). After bombardment with approximately 200µg (A), 100µg (B) and 30µg (C) micro-particles per bombardment.

sundoc.bibliothe
k.uni-halle.de/
diss.../prom.pdf

Biológica:

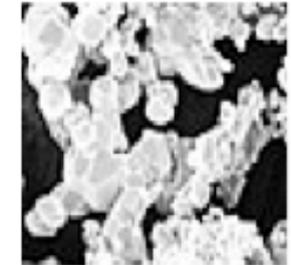
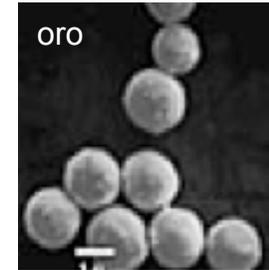
Optimización de parámetros (densidad de partículas/bombardeo, distancia al tejido diana y la presión He para la aceleración de micropartículas).

Actividad de los genes chivatos

Expresión transitoria de genes aumenta con la cantidad de partículas, pero una alta densidad de partículas daña los tejidos



Preparación del ADN



1. Preparación de ADN 1 mg/ml
2. Preparación de partículas de oro. Almacenar en alícuotas

1. Pesar 60 mg
2. Resuspenderlas en 1 ml de etanol
3. Centrifugar 14000 g 1 min. Repetir 2X
4. Resuspender en 1 ml de H₂O estéril

**Esterilización
con etanol**

3. Preparación suspensión ADN-partículas de oro

1. 5 µl de ADN en un eppendorf
2. Añadir 50 µl partículas de oro
3. Mezclar (vortex) 1 min a máxima velocidad
4. Añadir 50µl 2.5 M CaCl₂.
5. Añadir 20µl espermidina (0.1 mol/L)

**Adición de cationes
para favorecer la
adhesión Ca y
poliaminas**

Uso de aminosiloxanos mejora la eficiencia de la transformación a bajas dosis de DNA

6. Vortex 3 min a máxima velocidad
7. Centrifugar y resuspender el precipitado en 2.50µl de etanol
8. Vortex
9. Centrifugar. Resuspender el precipitado en 60µl etanol

4. Esterilizar los **macrocarriers** (sumergir en etanol 95% y secar al aire)
5. Añadir 10 µl de suspensión ADN-oro al centro del macrocarrier y secar



Biolística: ventajas y desventajas

Ventajas

- Funciona en sistemas donde fallan otros métodos de transformación
- Escasa dificultad
- Muy útil para el estudio de expresión transitoria (que no depende de la integración del transgen en el genoma)

Desventajas

- Equipamiento necesario
- Lesión de los tejidos (bombardeo y el vacío parcial) Optimización
- Integración al azar del ADN y
- Número de copias elevado. Existencia de reagrupamientos
 - Durante la preintegración los vectores se fusionan.
 - Alto número de copias en mismo locus



Tiempo estimado

Typical transformation regimes using *Agrobacterium* or DNA-coated microprojectiles. Annu Rev. Plant Mol Biol 48:297

Agrobacterium

Co-cultivar discos de hojas con *Agrobacterium*

↓ 1-2 días

Lavar los discos de hojas



Tratar con antibiótico para eliminar *Agrobacterium* y seleccionar las células vegetales transformadas

↓ 2-4 semanas

Cultivar los discos de hojas supervivientes a medio fresco de selección/regeneración

↓ 6-10 semanas

Enraizar las plántulas en medio selectivo

↓ 4-6 semanas

Endurecer las plantas transgénicas

TOTAL 12-20 semanas

Biolística

Iniciación y proliferación de callos embriogénicos

↓ 8-12 semanas

Bombardeo con microprojectiles



Crecimiento del callo en medio no selectivo

↓ 4 días

Crecimiento del callo en medio selectivo (antiescapes)

↓ 8-12 semanas

Regeneración de plántula y enraizamiento en medio de selección

↓ 8-12 semanas

Endurecer las plantas transgénicas

TOTAL 24-36 semanas



Silicon carbide fibres: WHISKERS™

Fibras de carburo de silicio

No requiere de ningún equipamiento especial

- Material vegetal (células suspensión, embriones, callos derivados de embriones) se introducen en un tampón que contiene el ADN y los WHISKERS™.
- Vortex
- Las fibras (0.3-0.6 μm de diámetro y 10-100 μm largo) penetran la pared y el plasmalema permitiendo la entrada del ADN.

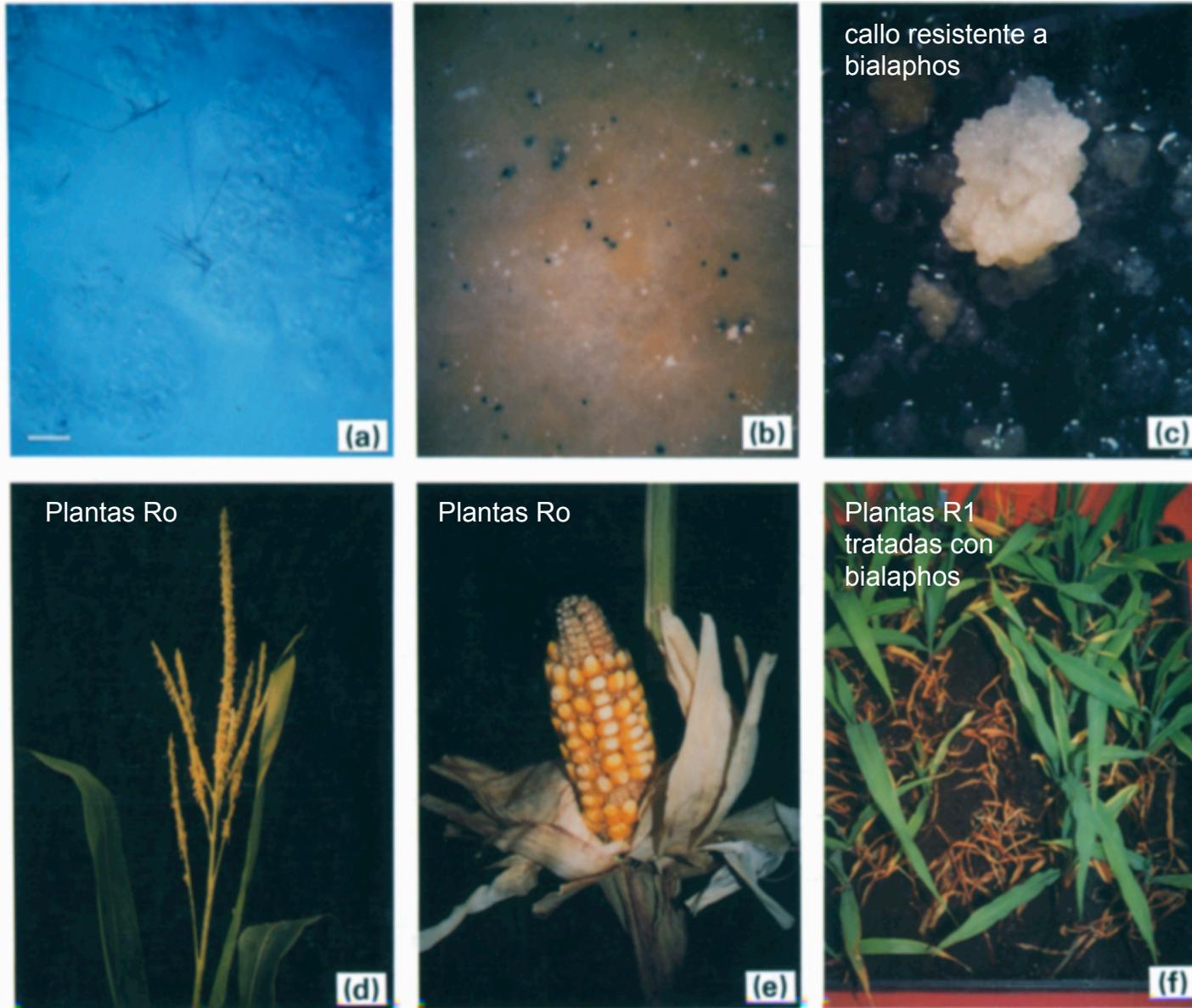
Desventajas:

Tipo de material adecuado (suspensiones celulares)

Lesiones provocadas (manejo cuidadoso)



suspensiones celulares WHISKERS™



Medio de selección:
herbicida bialaphos,
gen *bar*
Gen chivato:
Gen uidA (gus)

Production of fertile
transgenic maize plants
by silicon carbide
whisker-mediated
transformation. Plant J
(1994) 6:941

Figure 4. Whisker-mediated maize transformation.

(a) Association of silicon carbide whiskers (needle-like material) with A x B suspension cells visualized under light microscopy (Axioskop, Zeiss); Bar = 50 μ m; (b) transient GUS expression in cells after transformation; (c) bialaphos-resistant callus; (d) tassel and (e) ear of R₀ plant produced by whisker-mediated transformation; (f) R₁ progeny test recorded 2 weeks after herbicide spray. The non-transformed control plants exhibited severe necrosis within 4 days and died soon after (the middle row). The transgenic plants remained green and healthy.



Electroporación - transformación mediada por campos eléctricos

- **Fuerte pulso eléctrico origina poros transitorios en la membrana celular que permiten la incorporación de moléculas**
- **Células y DNA en cubeta entre dos electrodos**

- Alto DC (corriente continua) voltaje (500 V) se aplica como un pulso

- Tipo de onda:

- cuadrada parece funcionar mejor que

- pulsos de caída exponencial

- mejor bacterias

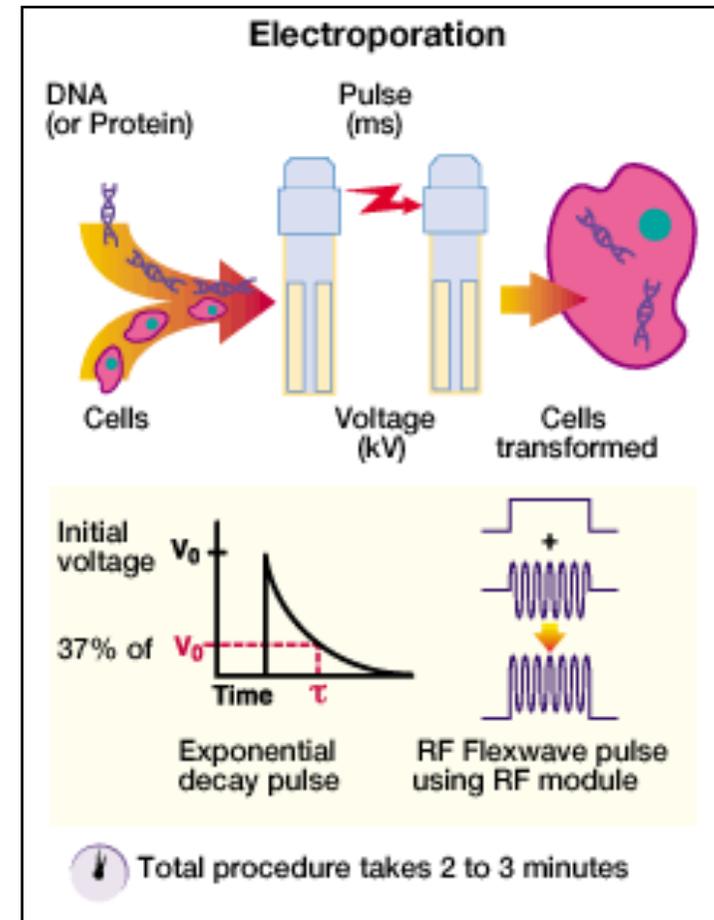
- **Parámetros a optimizar:**

- voltaje

- duración, forma del pulso

- forma de ADN (lineal: mejor)

- adición de espermidina (condensación del ADN)



Algunas experiencias con pulsos RF (*radio frequency*) son más efectivas (no aparatos)



Electroporación - transformación mediada por campos eléctricos

ventajas

- muy eficiente cuando funciona (40-60% de las células incorporan ADN y el 50% de las células sobreviven al tratamiento)
- bajo número de copias del transgén
- muy efectivo en la formación de células transformadas estables
- usado con éxito en transformación de cereales

desventajas

- funciona bien con células en suspensión
- equipamiento caro (cubetas)
- extensa optimización
- muy sensible a la concentración de sales (protoplastos se incuban en medio con bajo contenido en sales)
- requiere DNA muy purificado

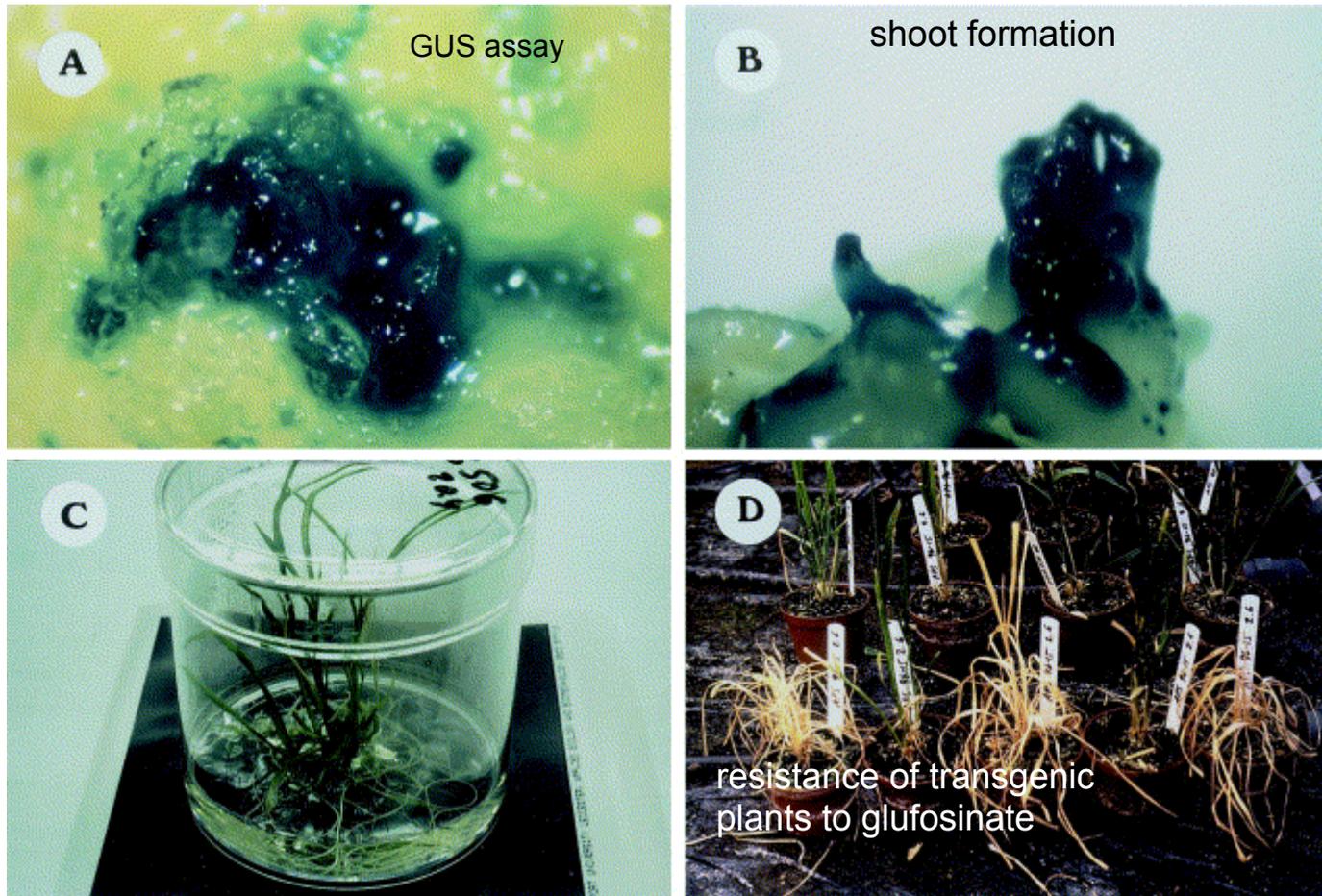


Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation

Field strength (V/cm)	State of plasmid	Number of embryos with visible GUS expression (%)	Mean number of GUS foci per embryo, (\pm S.E.M.)
275	No DNA	0	0
750	No DNA	0	0
275	Linear	0	0
→ 750	Linear	65 (32.5%)	0.98 \pm 0.11
275	Circular	0	0
→ 750	Circular	49 (24.5%)	0.41 \pm 0.06

Field strength, V/cm	Number of embryos electroporated	Number of plants after selection	Number of transgenic plants	Transformation frequency (%)
275	540	12	1	~ 0.2
750	540	9	2	~ 0.4





Regeneration of transgenic wheat plants (cv. Scamp) after tissue electroporation: (A) Transient GUS assay 7 days after electroporation; (B) shoot formation on regeneration medium; (C) root development on bialaphos containing medium (1 mg/l); (D) resistance of transgenic plants to spraying with ammonium glufosinate (30 mg/m²); three control non-transgenic plants died after spraying, while the transgenic plants continued their normal development.

Transformación mediada por polietilenglicol

Protoplastos (células vegetales sin pared celular) se pueden transformar con ADN usando **polietilenglicol (PEG)** en presencia de **cationes divalentes** (Ca^{2+}). PEG y Ca desestabilizan la **membrana** → se hace **permeable al ADN**.

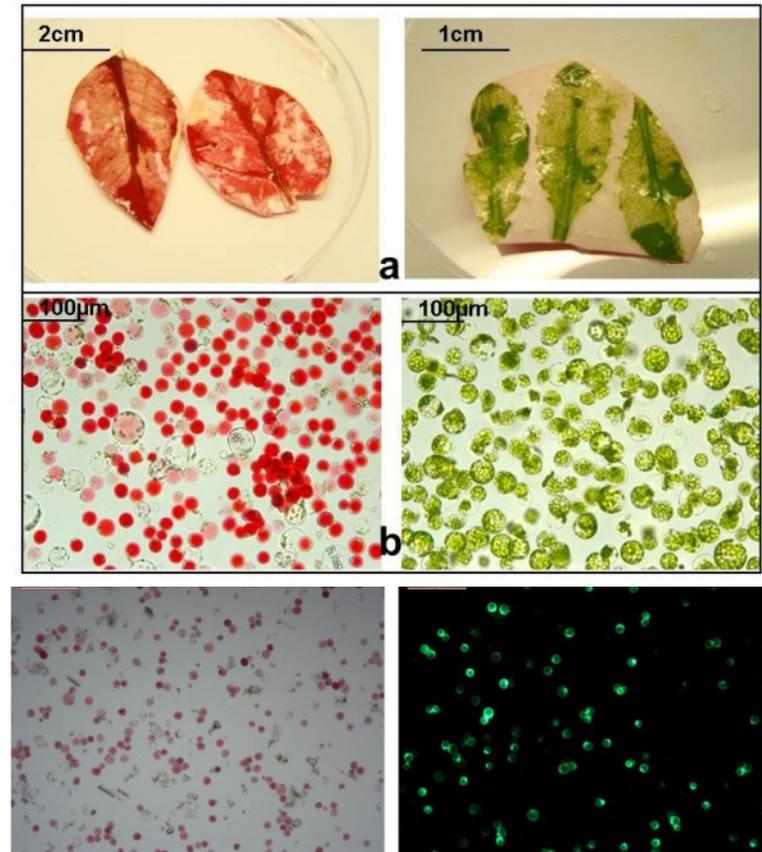
Una vez dentro de la célula, el ADN entra en el núcleo y se integra en el genoma.

Desventajas

- Uso de protoplastos: regeneración de plantas es complicado
- El ADN es susceptible de degradación y puede sufrir reagrupamientos

Ventajas

- Barato
- Empleado con éxito en diversas especies
 - Primer artículo (Krens et al. 1982 *Nature* 296:72), plásmido Ti de *Agrobacterium* introducido en protoplastos de petunia
 - Arroz (*Plant Physiol* 93(1990):857)
 - Patata (*PCTOC* 27(1991):105)
- Alto porcentaje de transformación
 - Optimización: Concentración de ADN y eficiencia transformación



Isolation of mesophyll protoplasts from red leaves of Poinsettia (left) and *Arabidopsis thaliana* (right)

Protoplasts were transformed with 0.7 µg of a DNA construct for constitutive expression of Yellow Fluorescent Protein. YFP expression was visualised after overnight incubation, using a UV microscope.

Plant Methods 2012 8:14

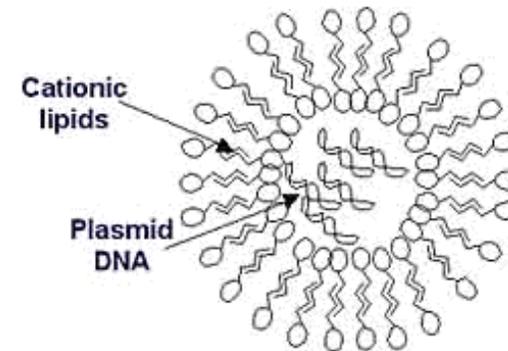


Lipoinfección - transfección mediada por liposomas

Obtención liposomas

- sonicación
- extrusión a través de un pequeño poro
- dilución medio acuoso
- **Tipos de liposomas**
 - SUV, **vesículas unilamelares pequeñas** 30-50 nm diámetro
 - LUV, **vesículas unilamelares grandes**, >150 nm diámetro
 - MLV, **vesículas multilamelares múltiples**, > 500 nm diámetro
 - LUV, más se utilizan
 - Volumen de encapsulación adecuado
 - Alto grado de reproducibilidad
 - Población homogénea por extrusión en filtros de policarbonato

1980's. Transformación directa de células mediante liposomas



Liposomas, vesículas microscópicas esféricas que se forman cuando los fosfolípidos se hidratan.

Liposomas encapsulan fragmentos de ADN y tras su fusión con las membranas, los liberan



Lipoinfección - liposomas

➤mezclar, interacción liposomas- células

- tiempo y temperatura de incubación
- relación liposomas/células mínima
- composición del tampón
- volumen de muestra
- grado de agitación

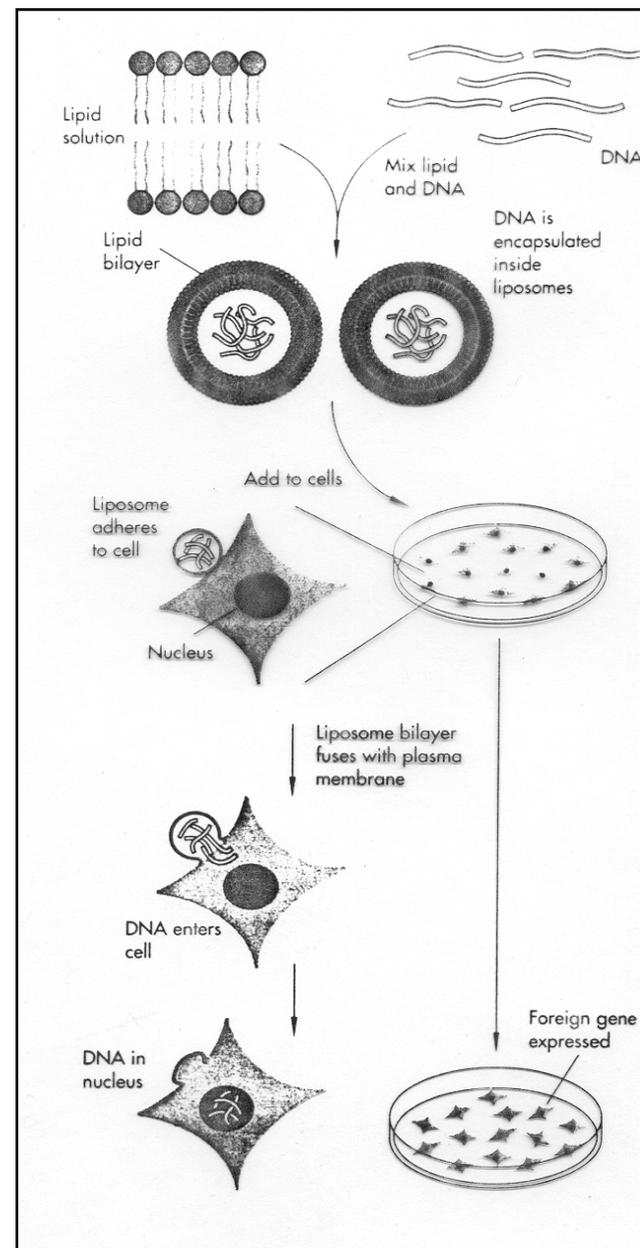
➤ todos funcionan en mayor o menor grado

- mezcla equimolar de lípidos catiónicos y neutros (dioleil-fofatidil-etanol-amina (DOPE), colesterol y dioleil-fofatidil colina (DOPC))

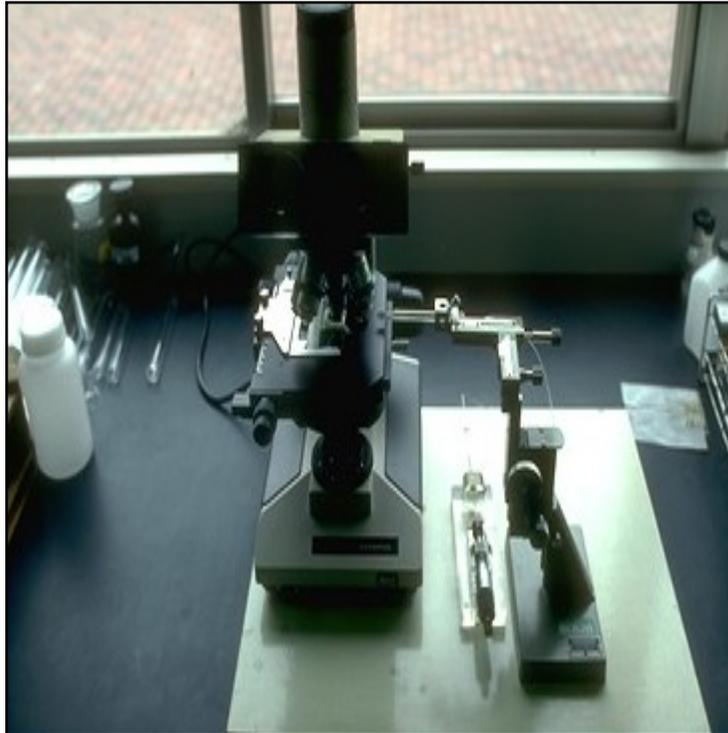
➤ Tipo de tejidos vegetales transformados mediante liposomas

- **Protoplastos** (facilitan la fusión, endocitosis)
- Polen (germinación)
- Callos y células dañadas ("parches" que exponen el plasmalema)

Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. Review 2004



Microinyección: inyección directa de ADN



Ventajas

- Cantidad de ADN vector pg
- Facilidad recuperar transformantes

Desventajas

- Tamaño núcleo/vacuola

