

Entrega del Premio “Pérez Companc” 2004



Sesión Pública Extraordinaria
del
21 de Diciembre de 2004

La transformación de cloroplastos

María Eugenia Segretín, Sonia Alejandra Wirth y Fernando Bravo Almonacid*

**Sr. Presidente de la Academia de Agronomía y Veterinaria,
Sr. Representante de la Fundación Pérez Companc,
Sres. Académicos,
Colegas y amigos,
Señoras y Señores:**

Antes que nada agradecemos emocionados, a la Fundación Pérez Companc el haber instituido este premio y a la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria el que nos lo concediera. Será siempre motivo de sano orgullo y agradecimiento.

Resumen

La transformación de cloroplastos presenta numerosas ventajas frente a otras metodologías de transformación vegetal, incluyendo mayor expresión de la proteína recombinante, contención del transgén y la posibilidad de expresar policistrones. Dado que la integración ocurre por recombinación homóloga, es posible dirigirla a sitios predeterminados del genoma plastídico evitando efectos de posición. En nuestro laboratorio hemos desarrollado dos vectores de transformación de cloroplastos de tabaco, que nos permitieron establecer esta técnica de transformación por primera vez en nuestro país.

La transformación genética de plantas es una herramienta que ha permitido el mejoramiento de las características agronómicas de los cultivos, así como su utilización como bioreactores para la producción de proteínas recombinantes de interés farmacológico o industrial (Fischer *et al.*, 2004; Giddings, 2001; Hood, 2002; Ma *et al.*, 2003).

A pesar de que los grandes avances producidos en esta área han permitido el desarrollo y la comercialización de diversas plantas transgénicas a nivel mundial, quedan

Agradecimientos:

Este trabajo fue financiado por un subsidio otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica Proyecto PICT 2000 N° 08-08702. M.E.S. y S.A.W. son becarias doctorales y F.B.A. es investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

*Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)
CONICET

aún aspectos de importancia económica y ecológica por mejorar. Entre ellos, la necesidad de restringir la transferencia genética horizontal entre las plantas transgénicas y otros organismos y la de incrementar los niveles de expresión de las proteínas heterólogas para optimizar los costos de producción o para alcanzar mayores niveles de resistencia a patógenos y de tolerancia a factores abióticos. Una estrategia para alcanzar estos objetivos consiste en la transformación de los plástidos vegetales.

Los plástidos vegetales son organelas que se originaron por endosimbiosis entre un organismo procariota fotosintético y un organismo eucariota ancestrales, y son responsables de múltiples funciones que incluyen la fotosíntesis (cloroplastos), el almacenamiento de almidón y aceites (amiloplastos y elaioplastos), la coloración de frutos, flores y raíces (cromoplastos), y la síntesis de monoterpenos (leucoplastos), entre otras. Estos distintos tipos de plástidos se diferencian a partir de un proplástido progenitor presente en las células meristemáticas y poseen una gran capacidad de dediferenciación y rediferenciación (Stæhelin y Newcomb, 2000). Por tanto, a partir de la transformación de un tipo de plástido, se

podría conseguir la expresión de un gen foráneo en distintos tejidos de la planta (hojas, tubérculos, frutos).

El genoma plastídico o plastoma es altamente poliploide y está compuesto por una molécula de ADN circular de doble cadena de 120 a 180 Kpb que contiene entre 130 y 150 genes. Los demás polipéptidos requeridos para las múltiples funciones de los plástidos están codificados por el genoma nuclear y son importados desde el citoplasma. Los genes plastídicos pueden agruparse en dos categorías: a) los genes involucrados en la fotosíntesis y b) los genes involucrados en los procesos de replicación, transcripción y traducción (Bock y Khan 2004).

Una característica relacionada al origen procariota del sistema de expresión genético es que muchos de los genes plastídicos están organizados en operones. Además, la mayoría de los genomas plastídicos estudiados poseen una organización genética muy conservada con cuatro regiones bien definidas: una región mayor de genes simple copia (CSL) una región menor de genes simple copia (CSC) y dos regiones repetidas invertidas (RIA e RIB) que separan las regiones de simple copia (Figura 1).

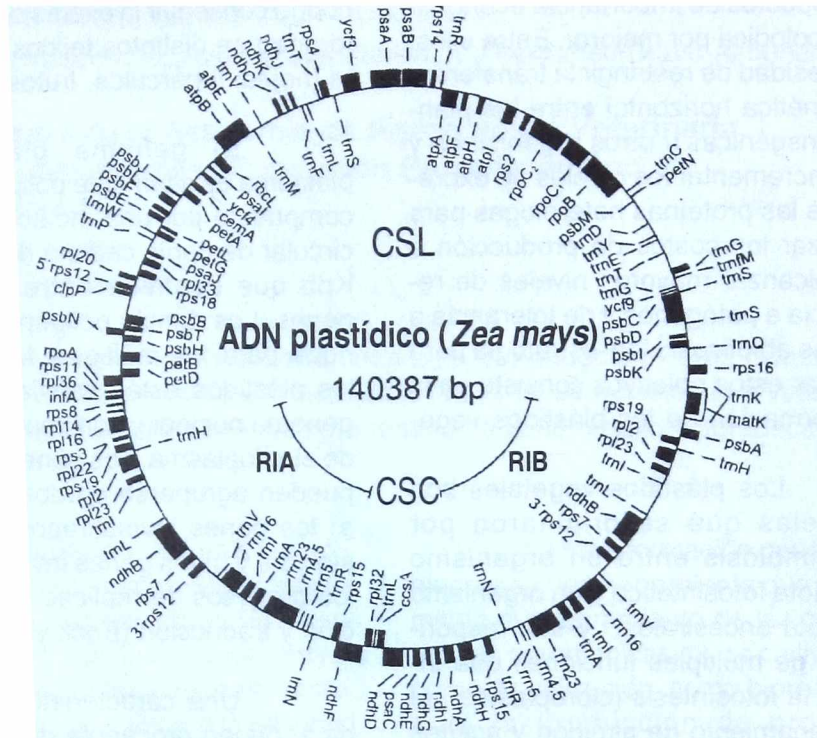


Figura 1. Mapa físico del genoma plastídico de maíz (*Zea mays*). Se muestra la ubicación de los genes en ambas cadenas, así como de las regiones repetidas invertidas A y B (RIA y RIB) y de las regiones de copia simple larga (CSL) y corta (CSC) (Tomado de Hager y Bock, 2000).

La transformación de cloroplastos se produce por recombinación homóloga entre secuencias plastídicas que flanquean la construcción genética a introducir y las secuencias correspondientes en el plastoma (Figura 2). De esta manera, es posible seleccionar el sitio de inserción evitando los efectos de posición característicos de la transformación nuclear. Este mecanismo permite además realizar estudios genéticos por eliminación o reemplazo

de genes, así como por reconstitución de funciones (Leister, 2003). Como además este proceso de transformación puede involucrar múltiples eventos de recombinación (Kavanagh et al., 1999), es posible utilizar las mismas secuencias flanqueantes para transformar distintas especies vegetales, contribuyendo al desarrollo de vectores de transformación que son funcionales en más de una especie (Ruf et al., 2001; Sidorov et al., 1999).

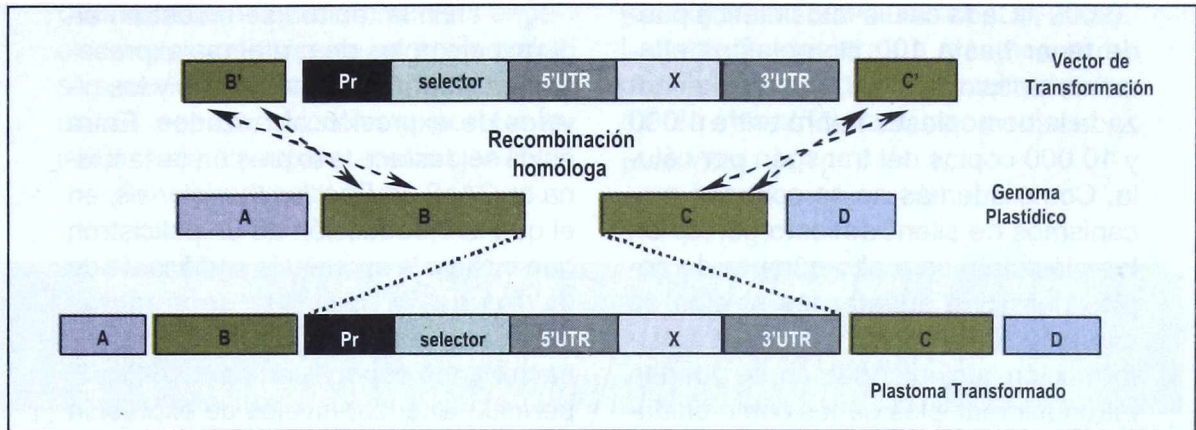


Figura 2. Transformación del genoma plastídico por recombinación homóloga. Las secuencias B' y C' de origen plastídico recombinan con el plastoma para insertar la construcción genética en la región intergénica entre B y C. Pr: promotor, selector: secuencia que otorga resistencia a un agente selectivo, x: secuencia de interés, 5' UTR y 3' UTR: secuencias 5' y 3' no traducidas respectivamente.

El evento de transformación inicial involucra la integración del ADN transformante en una o unas pocas copias del genoma plastídico presentes en cada célula. Durante las subsecuentes divisiones de células y organelas, la presencia de altas concentraciones del agente selectivo (generalmente espectinomicina) favorece

la multiplicación de los plástidos que contengan su genoma transformado. De esta forma luego de sucesivas rondas de regeneración en un medio selectivo, puede alcanzarse un estado denominado homoplastía en el que cada copia del plastoma es recombinante (Figura 3), (Bock, 2001).

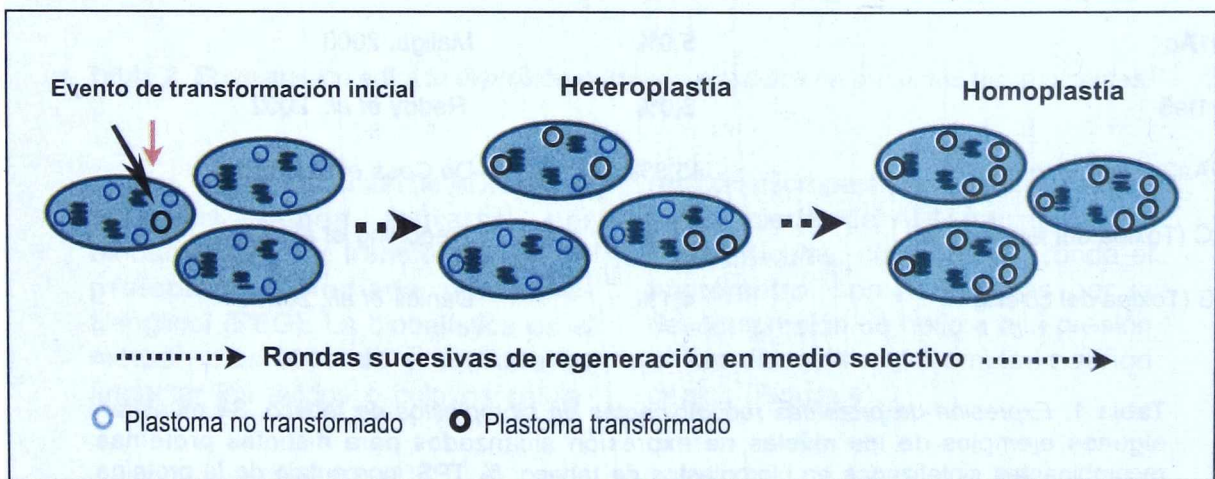


Figura 3. Mecanismo de selección de los plastomas transformados. La homoplastía se alcanza luego de sucesivas rondas de regeneración del tejido vegetal en un medio selectivo

Cada célula fotosintética puede tener hasta 100 cloroplastos altamente poliploides; así, una vez alcanzada la homoplastía habrá entre 1.000 y 10.000 copias del transgén por célula. Como además no se conocen mecanismos de silenciamiento génico en los plástidos, este alto número de copias permitiría superar los niveles de expresión obtenidos mediante la transformación nuclear. Además, se pueden introducir múltiples genes como unidades transcripcionales policistrónicas. Esto abre la posibilidad de incorporar rutas metabólicas completas, como por ejemplo la de síntesis de la vitamina A (Bock y Khan, 2004).

En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de proteínas expresadas en cloroplastos de tabaco y los niveles de expresión alcanzados. Entre estos se destaca la expresión de la toxina cry2Aa2 de *Bacillus thuringiensis*, en el que la introducción de un policistrón que incluye la secuencia codificante de la toxina y de las secuencias codificantes de las chaperonas bacterianas específicas para cry2Aa2, permitió alcanzar niveles de expresión tan altos como el 45% de TPS (total de las proteínas solubles) y un alto nivel de protección frente al ataque de insectos (De Cosa *et al.*, 2001).

Proteína	Nivel de expresión (% de TPS)	Referencia
EPSPS (resistencia a glifosato)	>10%	Ye <i>et al.</i> , 2001
Somatotropina humana	7,0%	Staub <i>et al.</i> , 2000
Seroalbúmina humana	11,0 %	Fernández-San Millán <i>et al.</i> , 2003
bar (resistencia a fosfoinotricina)	7,0 %	Lutz <i>et al.</i> , 2001
Cry1Ac	5.0%	Maliga, 2003
Cry1Ia5	3.0%	Reddy <i>et al.</i> , 2002
CryAa2 (operón completo)	45,3%	De Cosa <i>et al.</i> , 2001
TetC (Toxina del tétanos)	25 %	Tregoning <i>et al.</i> , 2003
CTB (Toxina del cólera)	4,1%	Daniell <i>et al.</i> , 2001

Tabla 1. Expresión de proteínas recombinantes en cloroplastos de tabaco. Se muestran algunos ejemplos de los niveles de expresión alcanzados para distintas proteínas recombinantes sintetizadas en cloroplastos de tabaco. % TPS: porcentaje de la proteína recombinante respecto del total de las proteínas solubles.

Otra ventaja es que, en muchas especies, los cloroplastos se heredan exclusivamente por vía materna, impidiendo su pasaje al polen y por tanto incrementando la contención genética

(Bock y Khan, 2004; Daniell *et al*, 2002). La tabla 2, muestra un resumen comparando las principales características de la transformación nuclear y plastídica

	Genomas	
	Plastídico	Nuclear
Número de copias	~10.000/célula	Pocas copias
Niveles de expresión	Altos Entre el 2-7% (hasta 47%)	Por lo general bajos Entre 0,001-0,1%
Genes y expresión	Operones	Monocistrónicos
Efectos de posición	Inserción en sitio conocido elimina este problema	Inserción al azar (expresión variable)
Silenciamiento génico	No se ha reportado	Existen numerosos reportes
Transferencia horizontal	No: herencia materna	Sí
Plegamiento y formación de puentes disulfuro	Correcto	Correcto (pasando por retículo endoplasmático)

Tabla 2. Comparación entre la expresión nuclear y plastídica de proteínas recombinantes.

La introducción de ADN en los plástidos puede lograrse por biobalística o por transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol (PEG). La biobalística es el método más utilizado y consiste en impactar los tejidos o cultivos celulares

con micropartículas de oro o tungsteno cubiertas del ADN transformante. Las partículas, cuyo tamaño ronda el micrómetro, son aceleradas por la descompresión de helio a alta presión en un dispositivo denominado cañón génico (Figura 4).

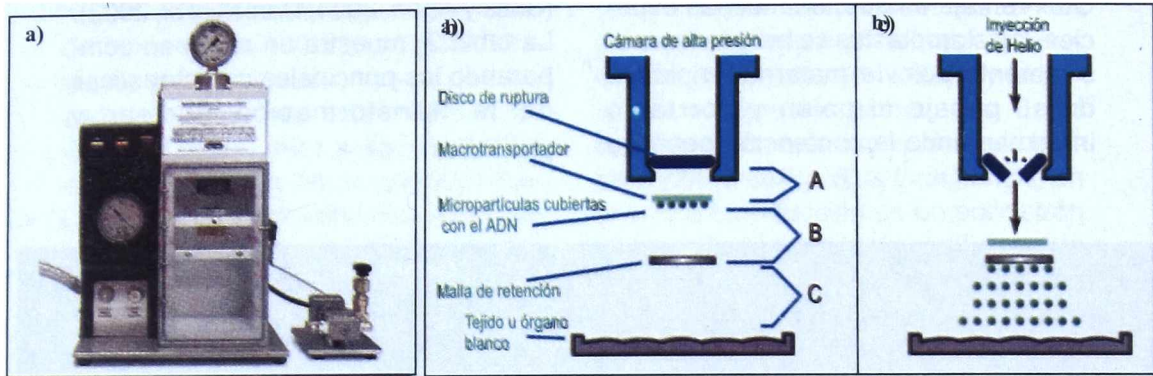


Figura 4. Transformación vegetal por biobalística. a) dispositivo PDS-1000/He (BioRad), empleado en biobalística. b) Esquema previo al disparo c) El helio inyectado en la cámara de alta presión provoca que el disco de ruptura se fracture. El gas rápidamente descomprimido impulsa el macrotransportador contra la malla de retención liberando las micropartículas con el ADN, que viajan hasta penetrar el tejido blanco. Las distancias A, B y C pueden ser modificadas y determinan la velocidad final que alcanzarán las micropartículas y por lo tanto la capacidad de penetración en el tejido bombardeado.

Aunque se ha informado la transformación de plástidos de papa (Sidorov *et al.*, 1999), tomate (Ruf *et al.*, 2001) y brasicáceas como *A. thaliana* (Sikdar *et al.*, 1998), *Brassica napus* (Hou *et al.*, 2002) y *Lesquerella fendleri* (Skrjinskaia *et al.*, 2003), esta técnica se aplica de rutina sólo en el alga *C. reinhardtii* y en tabaco.

Los plásmidos de transformación son en general derivados de vectores de *E. coli* en los que la construcción genética a introducir está flanqueada por secuencias plastídicas de entre 1 y 2 Kpb que determinarán el sitio de inserción en el plastoma. Estas secuencias no poseen propiedades particulares y, en teoría, pueden derivar de cualquier parte del genoma plastídico. Alrededor de 14 regiones intergénicas fueron probadas, sin que la inserción de secuencias heterólogas interfiera con la expresión de los genes plastídicos (Maliga, 2004).

En la construcción genética, las secuencias heterólogas pueden

estar ordenadas en operones, cada una con su secuencia de unión al ribosoma (RBS), o bajo la regulación de secuencias 5' no traducidas (5'UTR) más complejas que ayuden a estabilizar los ARNm e incrementar los niveles de traducción. Estas secuencias 5' UTR pueden ser plastídicas, como las del gen *psbA* (subunidad D1 del fotosistema II) o del gen *rbcl* (subunidad mayor de la rubisco) o incluso de origen viral como la del gen 10 del fago T7. La construcción completa puede estar bajo el control transcripcional de un único promotor o cada gen puede llevar un promotor independiente. Además, la correcta formación de los ARNm maduros requiere de la presencia de secuencias 3' UTR específicas. Las más utilizadas son las de los genes *psbA*, *rbcl* y *rps16* (proteína ribosomal 16S). La importancia de la elección de estas secuencias estabilizadoras se ve reflejada en distintos ejemplos. Los niveles de expresión de la seroalbúmina humana en cloroplastos de tabaco se incrementaron de un 0,02% a un 0,11%

TPS al reemplazar la secuencia RBS por el promotor y la región 5' UTR del gen *psbA* (Fernández-San Millán *et al.*, 2003). En otro caso, al expresar en tabaco el gen *CP4* que otorga resistencia al herbicida glifosato, se logró incrementar los rendimientos de un 0,002% TPS hasta un 0,3% TPS al reemplazar la secuencia 5' UTR del gen *rbcL* por la del gen 10 de fago T7, y hasta un 10% TPS mediante la fusión amino terminal a los primeros 14 aminoácidos de la proteína GFP (Ye *et al.*, 2001).

En nuestro laboratorio, hemos desarrollado dos vectores para la transformación de cloroplastos de tabaco: pBSW y pBSWUTR. En ellos, la secuencia *aadA*, que codifica la aminoglicosido-3-adenililtransferasa que otorga resistencia a espectinomicina se clonó bajo el control transcripcional del promotor Prn del operón de genes ribosomales y el terminador del gen *rps16* (Figura 5). En el vector pBSW, los sitios Nde I y Xba I, permiten el clonado de la secuencia

de interés formando un operón con la secuencia *aadA* y separada de ésta por una secuencia consenso de unión al ribosoma (RBS). En el vector pBSWUTR, el RBS se reemplazó por la secuencia 5'UTR del gen *psbA*, que incluye el promotor de este gen y secuencias que son reconocidas por distintos factores reguladores que estabilizan el ARNm e incrementan la traducción en respuesta a la luz.

En ambos vectores se utilizaron como secuencias flanqueantes dos fragmentos de alrededor de 1.000 pb que comprenden la región 3' de la secuencia del ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) y la secuencia del ARN de transferencia para isoleucina (*trnI*) y parte de la secuencia del ARN de transferencia para alanina (*trnA*). De esta forma la construcción genética clonada entre estas secuencias es insertada en la región intergénica entre el ARNr 16S y el *trnI*, en el operón de genes ribosomales ubicado en las regiones repetidas invertidas del plastoma de tabaco.

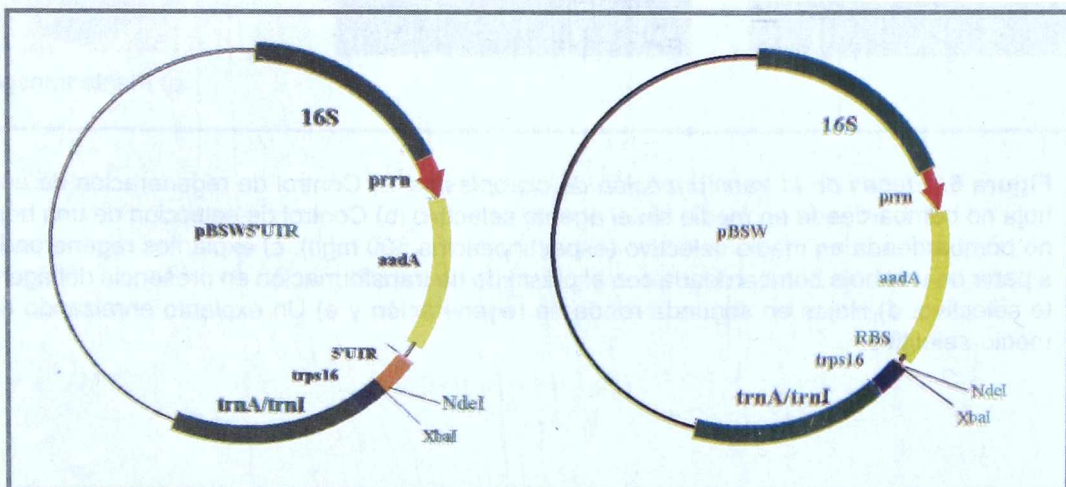


Figura 5. Mapa de los vectores pBSW y pBSWUTR. La secuencia de interés es clonada en los sitios únicos Nde I y Xba I en ambos vectores. 16S, *trnI* y *trnA*: secuencias flanqueantes. Prn: promotor *rrn* del operón de los ARNr plastídicos de tabaco, *aadA*: selector, RBS: sitio de unión al ribosoma, 5'UTR: secuencia 5' no traducida del gen *psbA*, Trps16: terminador del gen *rps16*.

Estos vectores se utilizaron para establecer los parámetros de transformación de cloroplastos de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv Petit Havana) por biobalística. En la figura

6 se pueden observar las distintas etapas de la transformación hasta la obtención de las plantas transplastómicas.

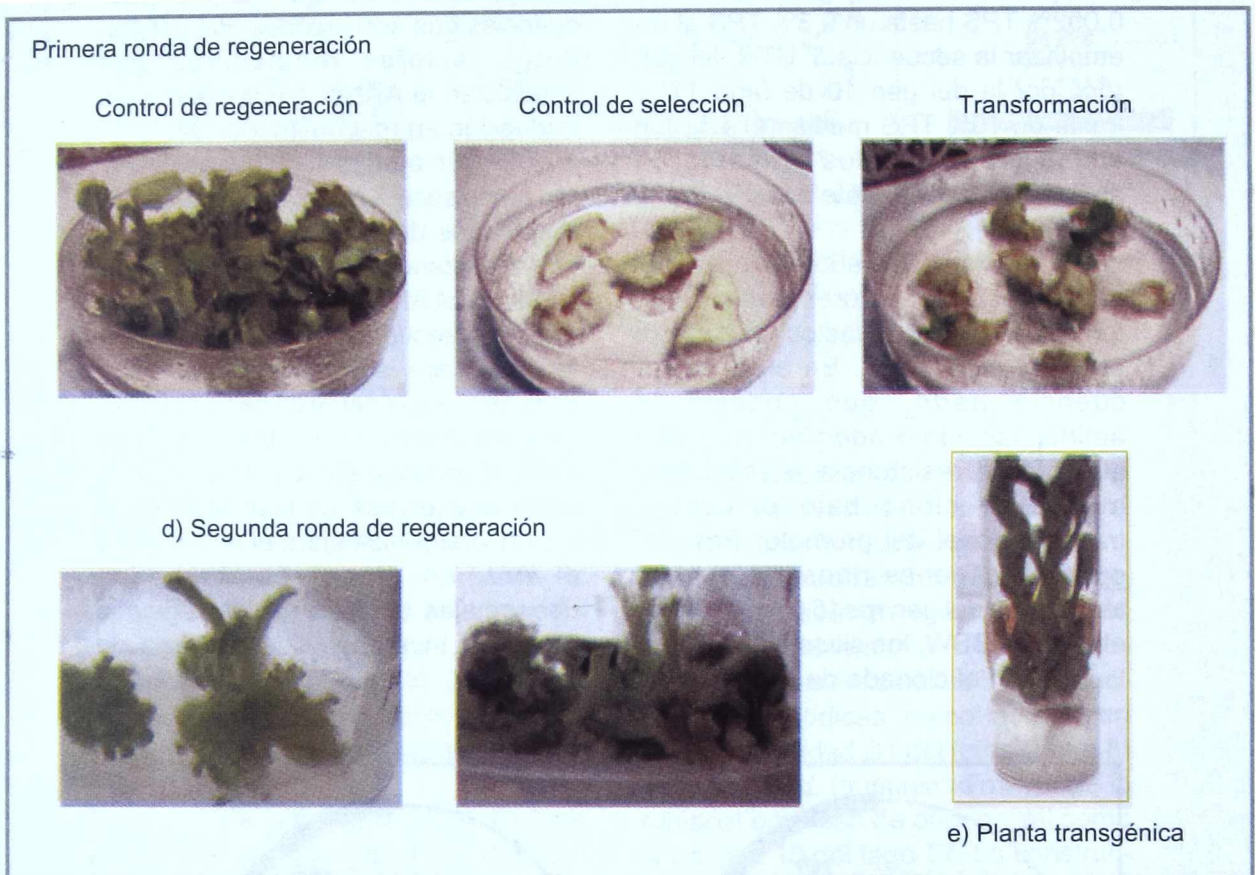


Figura 6. Etapas de la transformación de cloroplastos. a) Control de regeneración de una hoja no bombardeada en medio sin el agente selectivo. b) Control de selección de una hoja no bombardeada en medio selectivo (espectinomicina 500 mg/l). c) explantos regenerando a partir de una hoja bombardeada con el plásmido de transformación en presencia del agente selectivo. d) Hojas en segunda ronda de regeneración y e) Un explanto enraizando en medio selectivo.

Conclusiones y perspectivas

Los altos niveles de expresión que potencialmente pueden alcanzarse, la ausencia de efectos de posición y de silenciamiento génico, la posibilidad de incorporar policistrones, así como la contención del transgén en especies de herencia materna han convertido a los cloroplastos en un blanco sumamente atractivo para su utilización en la expresión de proteínas recombinantes.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado dos vectores para la transformación de cloroplastos de tabaco, que permitieron establecer esta técnica por primera vez en la Argentina. Con

el fin de explotar las potencialidades de esta herramienta, es nuestro objetivo expandir la aplicación de esta técnica de transformación a otras especies de importancia agronómica, para la obtención de plantas resistentes a distintos patógenos y factores abióticos. Además, se utilizará para la optimización de la producción de proteínas recombinantes de uso farmacológico o industrial en bio-reactores vegetales, uno de los principales objetivos de la agricultura molecular.

Nada más y nuevamente nuestro agradecimiento por la distinción recibida, así como por el subsidio y vuestra atención a esta charla.

Referencias

1. **Bock, R. (2001).** Transgenic Plastids in Basic Research and Plant Biotechnology. *J. Molecular Biology*, 312: 425-438.
2. **Bock, R., & Khan, M. (2004).** Taming plastids for a green future. *Trends in Biotechnology*, 22: 311-318
3. **Daniell H., Lee S., Panchal T., & Wiebe P. (2001).** Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly of functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *Journal of Molecular Biology*, 311: 1001-1009.
4. **Daniell, H., Khan, M., & Allison, L. (2002)** Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in Plant Science*, 7: 84-91.
5. **De Cosa, B., Moar, W., Lee., S-B., Miller, M., & Daniell, H. (2001).** Overexpression of the *Bt cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnology*, 19: 71-74.
6. **Fernández-San Millán, A., Mingo-Castel, A., Miller, M., & Daniell, H. (2003)** A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnology Journal*, 1: 71-79.
7. **Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. and Twyman R. (2004).** Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:152-158.
8. **Giddings, G (2001).** Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 450-454.
9. **Hager, M., & Bock, R. (2000).** Enslaved bacteria as a new hope for plant biotechnologists *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 302-310.
10. **Hood, E. (2002).** From green plants to industrial enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 279-283.
11. **Hou, B-K., Zhou, Y-H., Wan, L-H., Zhang Z-L., Shen, G-F., Chen, Z-H., & Hu, Z-M. (2002)** Chloroplast transformation in oilseed rape. *Transgenic Research*, 12: 111-114.

12. **Kavanagh, T., Thanh, N., Lao, N., McGrath, N., Peter, S., Horváth, E., Dix, P., & Medgyesy, P. (1999).** Homologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics*, 152: 1111-1122.
13. **Leister, D. (2003).** Chloroplast research in genomic age. *Trends in Genetics*, 19: 47-56.
14. **Lutz KA, Knapp JE, & Maliga P. (2001).** Expression of *bar* in the plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiology*, 125: 1585-1590.
15. **Ma J., Drake P., & Christou P., (2003).** The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, 4: 794-805.
16. **Maliga, P. (2003)** Progress toward commercialization of plastid transformation technology. *Trends in Biotechnology*, 21: 20-28.
17. **Maliga, P. (2004)** Plastid transformation in higher plants. *Annual Review in Plant Biology*, 55: 289-313.
18. **Reddy VS, Leelavathi S, Selvapandiyan A, Raman R, Giovanni F, Shukla, V., Bhatnagar R. (2002).** Analysis of chloroplast transformed tobacco plants with cry1la5 under rice psbA transcriptional elements reveal high level expression of Bt toxin without imposing yield penalty and stable inheritance of transplastome. *Molecular Breeding*, 9: 259-269
19. **Ruf, S., Hermann, M., Berger, I., Carrer, H., & Bock, R. (2001).** Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature Biotechnology*, 19: 870-875.
20. **Sidorov V., Kasten, D., Pang, S-Z., Hajdukiewicz, P., Staub, J., & Nehra, N. (1999).** Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker *The Plant Journal*, 19: 209-216.
21. **Sikdar, S., Serino, G., Chaudhuri, S., & Maliga, P. (1998)** Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* *Plant Cell Reports*, 18: 20-24.
22. **Skarjinskaia, M., Svab, Z., & Maliga, P. (2003).** Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicacea *Transgenic Research*, 12: 115-122.
23. **Staehelein, L., & Newcomb E.(2000)** Membrane structure and membranous organelles In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R.(eds.), American Society of Plant Physiologists.

24. **Staub J., Garcia B., Graves J., Hajdukiewicz P., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlittler M., Carroll J., Spatola, L., Ward, D., Ye, G., & Russell, D. (2000).** High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnology*, 18: 333-338.
25. **Tregoning J., Nixon, P., Kuroda, H., Svab, Z., Clare S., Bowe F., Fairweather N., Ytterberg J., van Wijk K., Dougan G., & Maliga P. (2003)** Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts *Nucleic Acid Research*, 31: 1174-1179.
26. **Ye G-N., Hajdukiewicz P., Broyles D., Rodriguez D., Xu C., Nehra N., & Staub J. (2001)** Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. *The Plant Journal*, 25: 261-270.