

# Biología Molecular

---

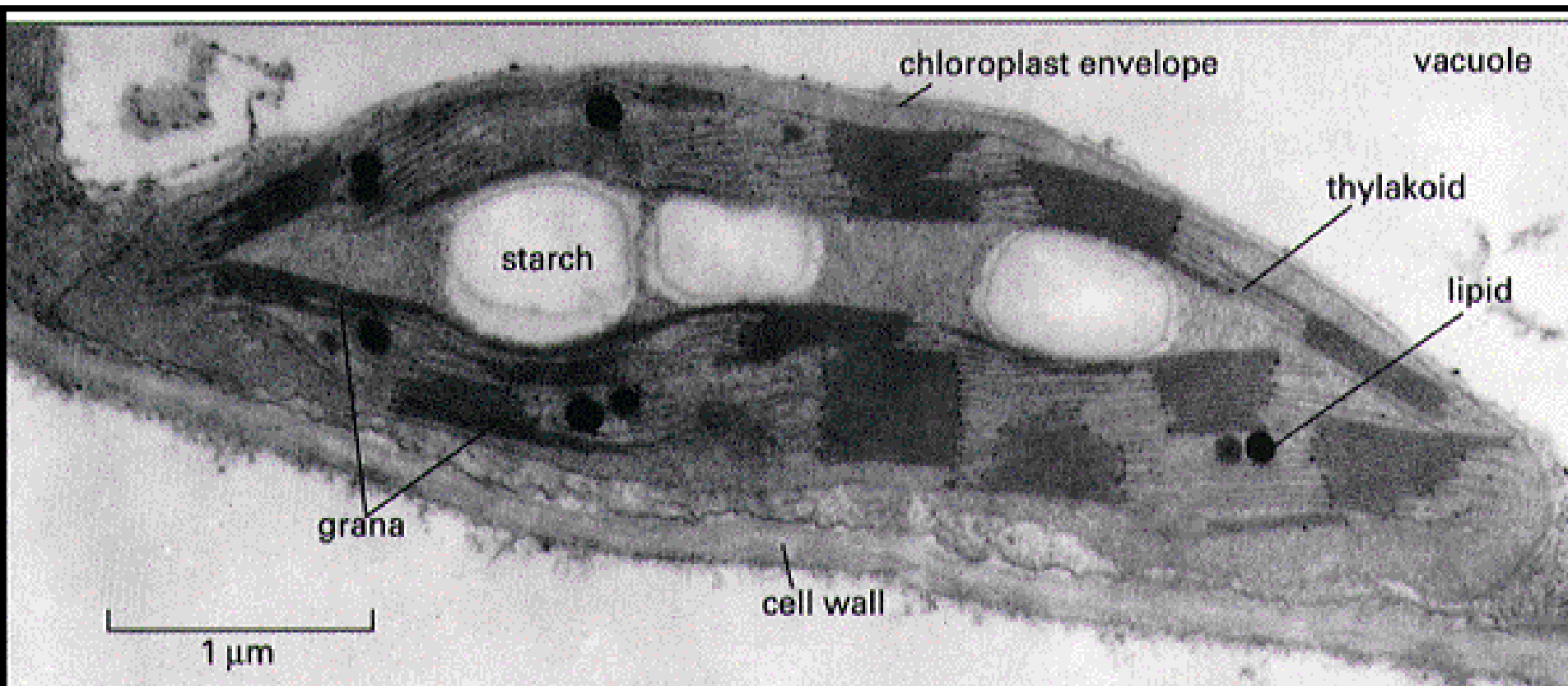
## 'Técnicas moleculares asociadas a los cloroplastos'

- Características estructurales y funcionales de los plastos
- Transformación genética de los plastos-**transplastómica**
  - Vectores
  - Métodos
- Algunos ejemplos de la transformación de plastos

Michael Handford  
mhandfor@uchile.cl  
19 de enero, 2012

# El cloroplasto -estructura

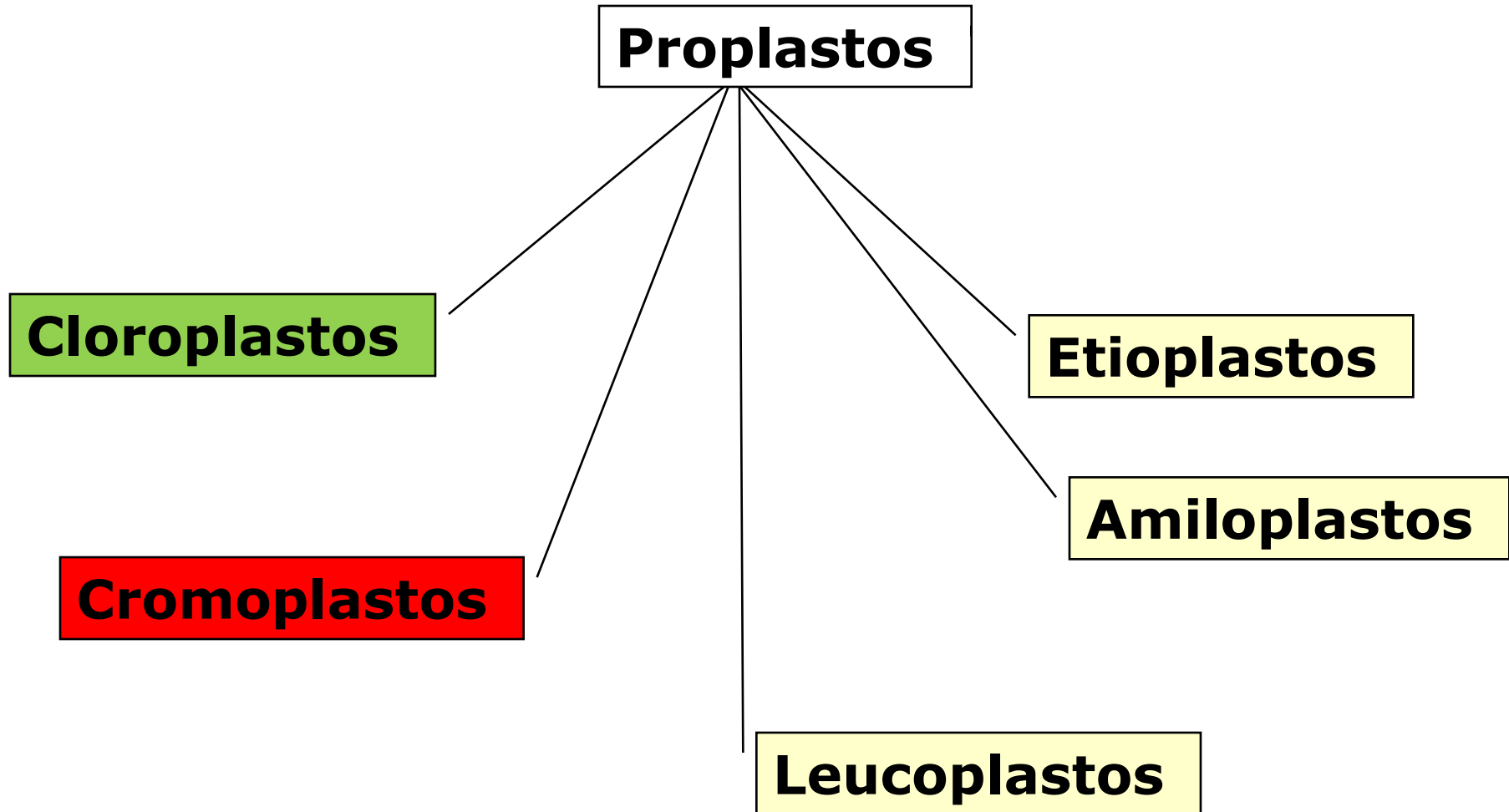
---



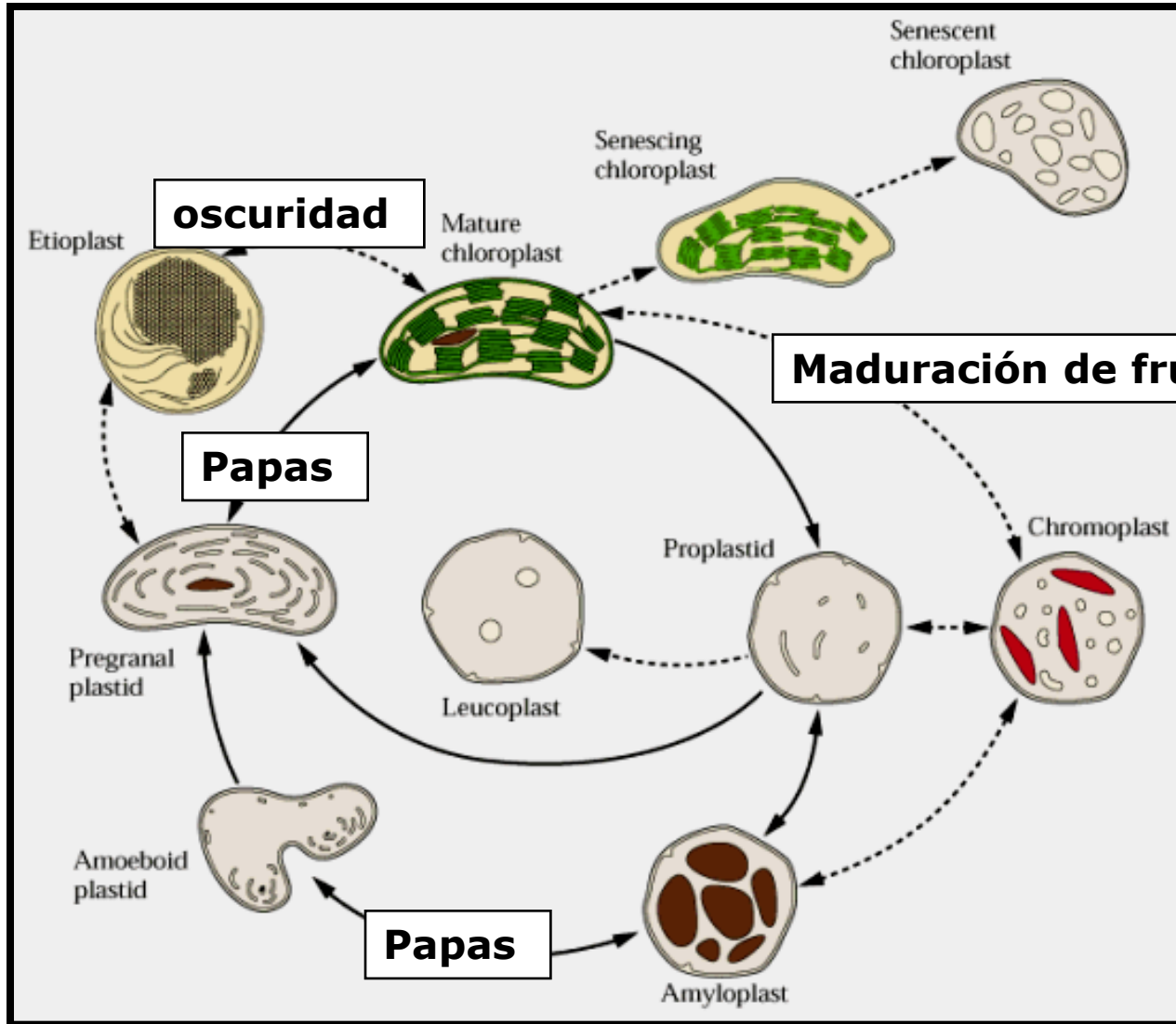
# Los cloroplastos son organelos de la familia de plastos

---

Rodeado por una cubierta formada por dos unidades de membrana

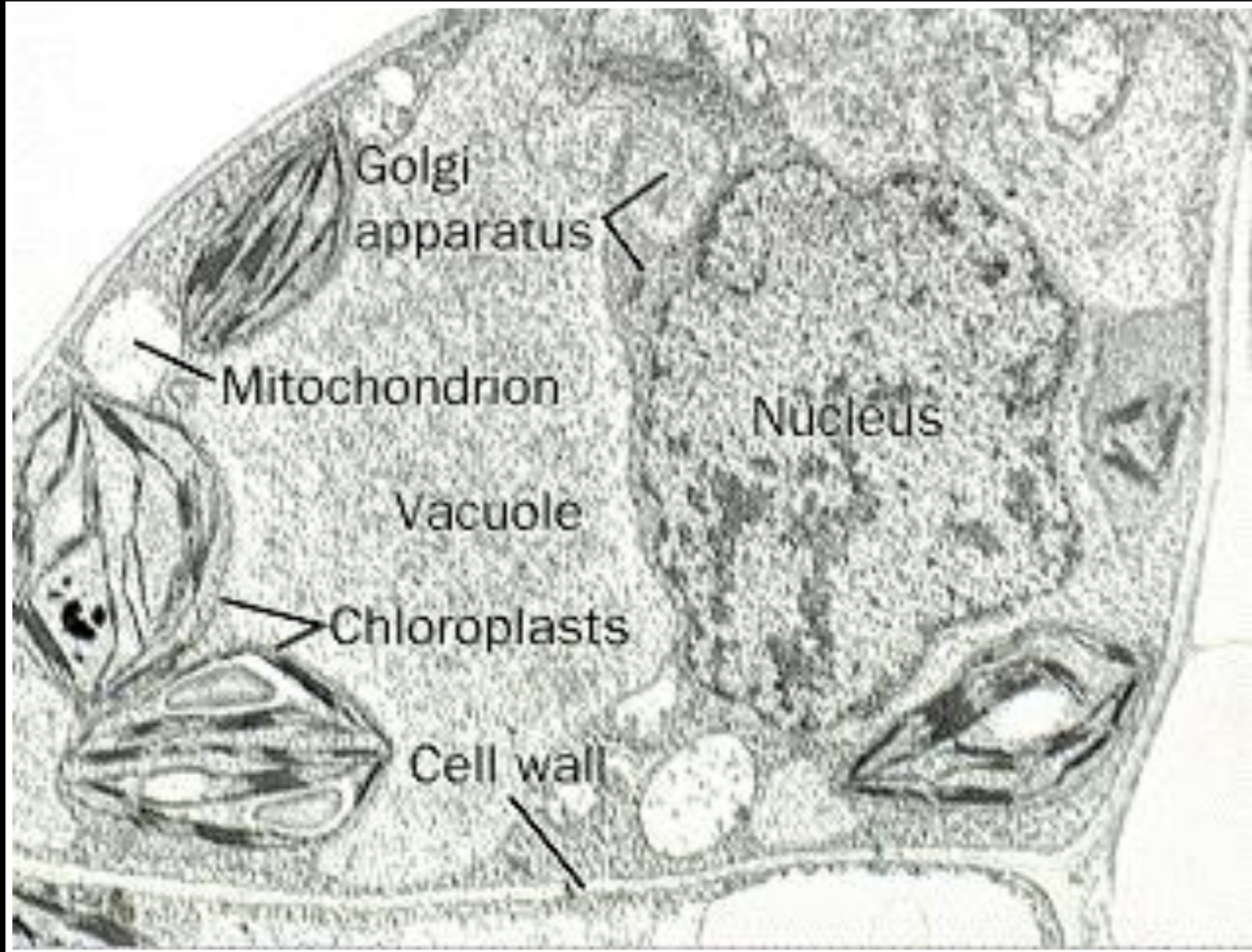


# Interconversión de los plastos durante el desarrollo



# DNA nuclear, mitochondrial y plastidial

---



# ¿Cuántas genomas hay en células vegetales?

---

## ■ NUCLEO

## ■ MITOCONDRIA

- circular, tamaño variable entre especies (100 kb - 500 kb; humanos 16 kb).
- Editado (en plantas).
- rRNA, tRNA y algunas (20) proteínas de respiración

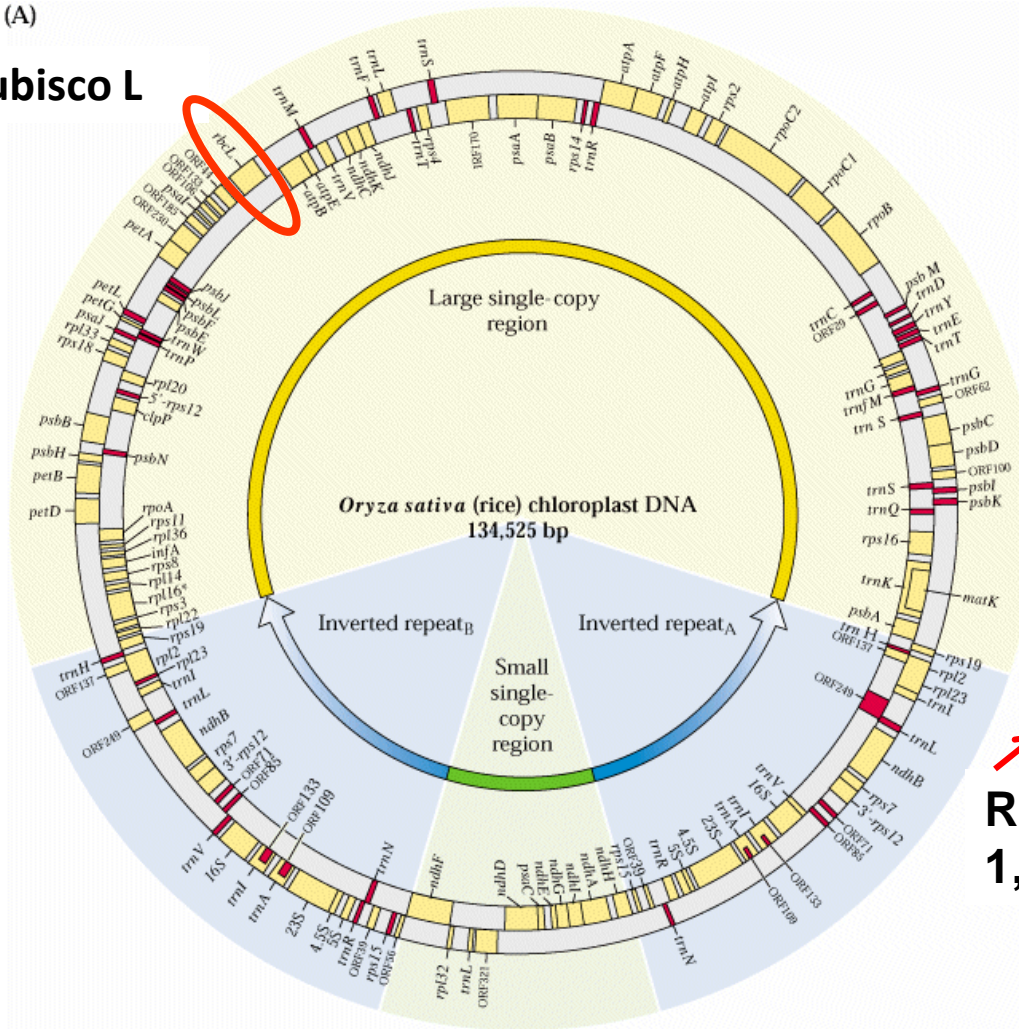
## ■ CLOROPLASTO

- circular, tamaño constante (arveja 120 kb, espinaca 150 kb)
- 150 genomas por cloroplasto (15% de DNA total)
- rRNA, tRNA, algunas (45) proteínas de fotosíntesis

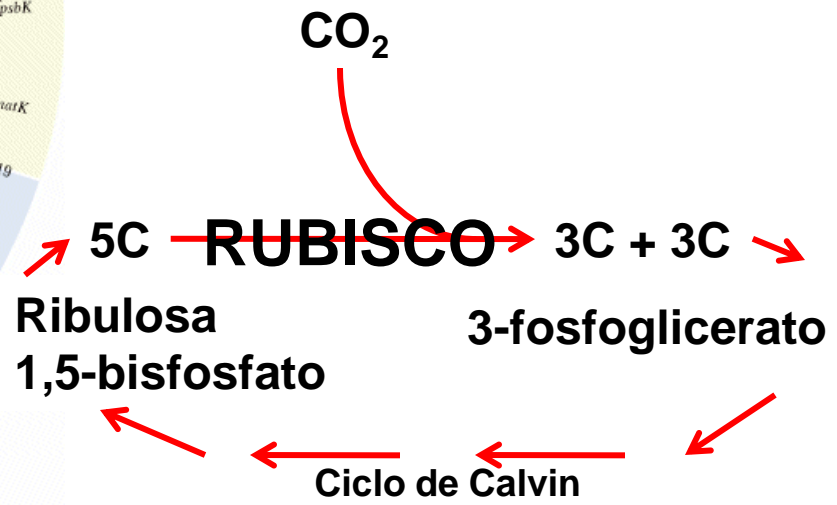
# Organización del genoma plastidial

(A)

Rubisco L



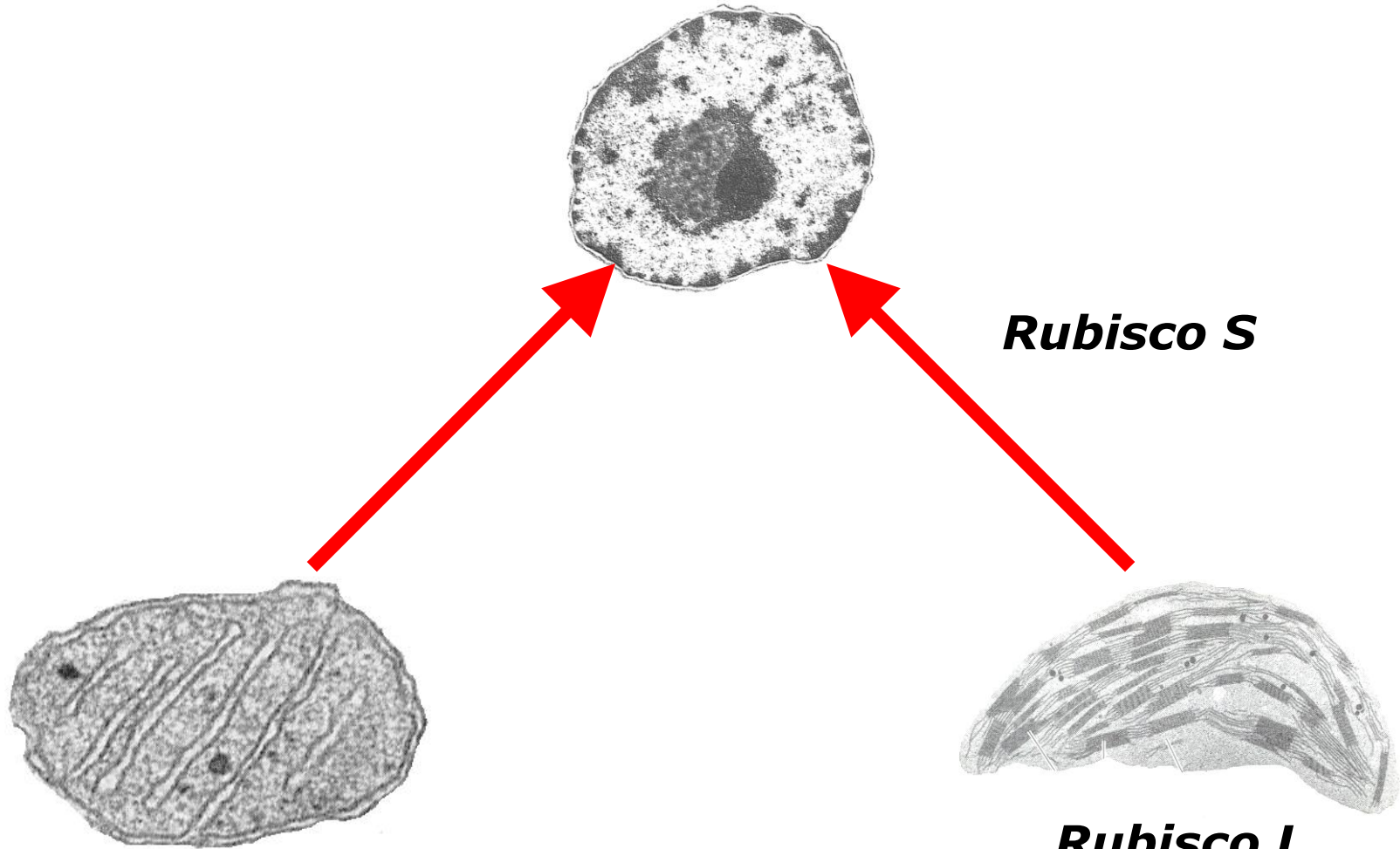
Rubisco, enzima funcional  
8x Rubisco L  
8x Rubisco S



Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa

# Movimiento de DNA intergenomal en plantas

---

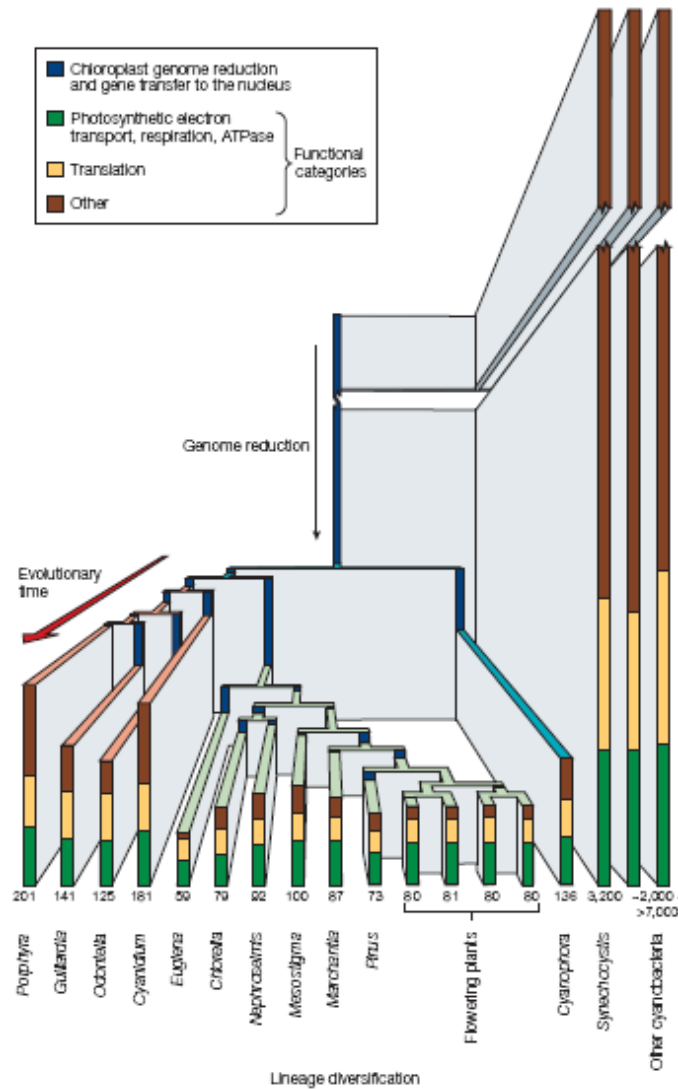


Cianobacteria  
Cloroplasto

– 1500 genes  
– 110-120 genes

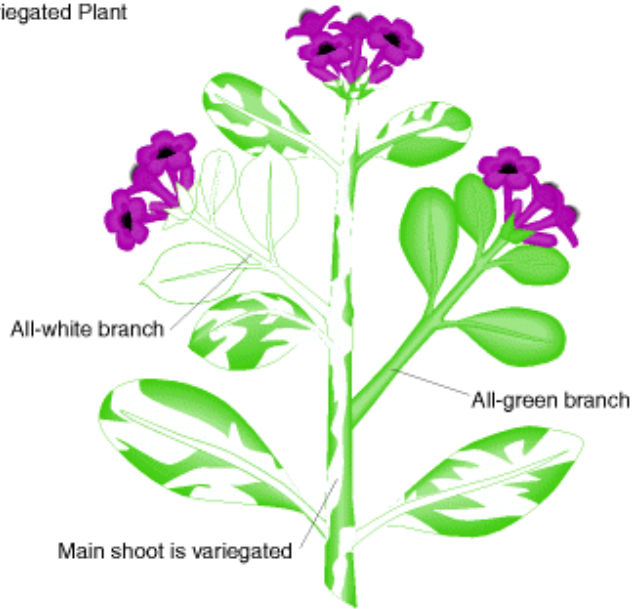


# Movimiento de DNA intergenomal en plantas



# Herencia de los cloroplastos

(a) Variegated Plant



Carl Correns (1909)  
*Mirabilis jalapa*

**Hembra**

Verde

Variegada

Blanca

**Macho**

Verde, variegada, blanca

Verde, variegada, blanca

Verde, variegada, blanca

**Fenotipo de progenie**

Verde

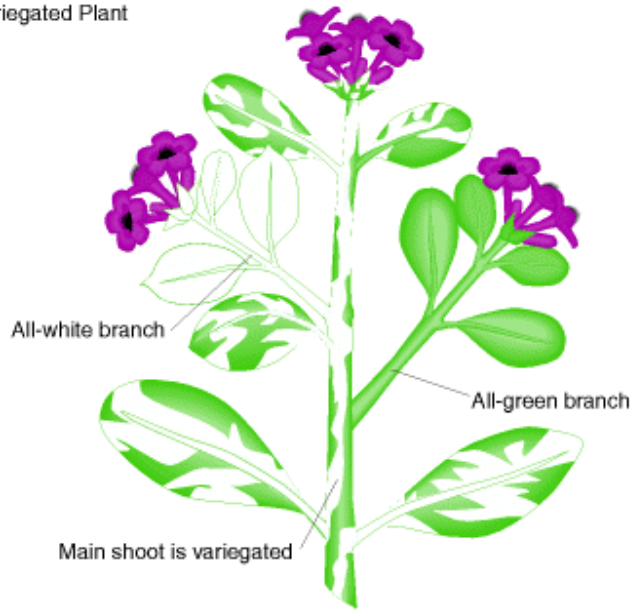
Variegada

Blanca

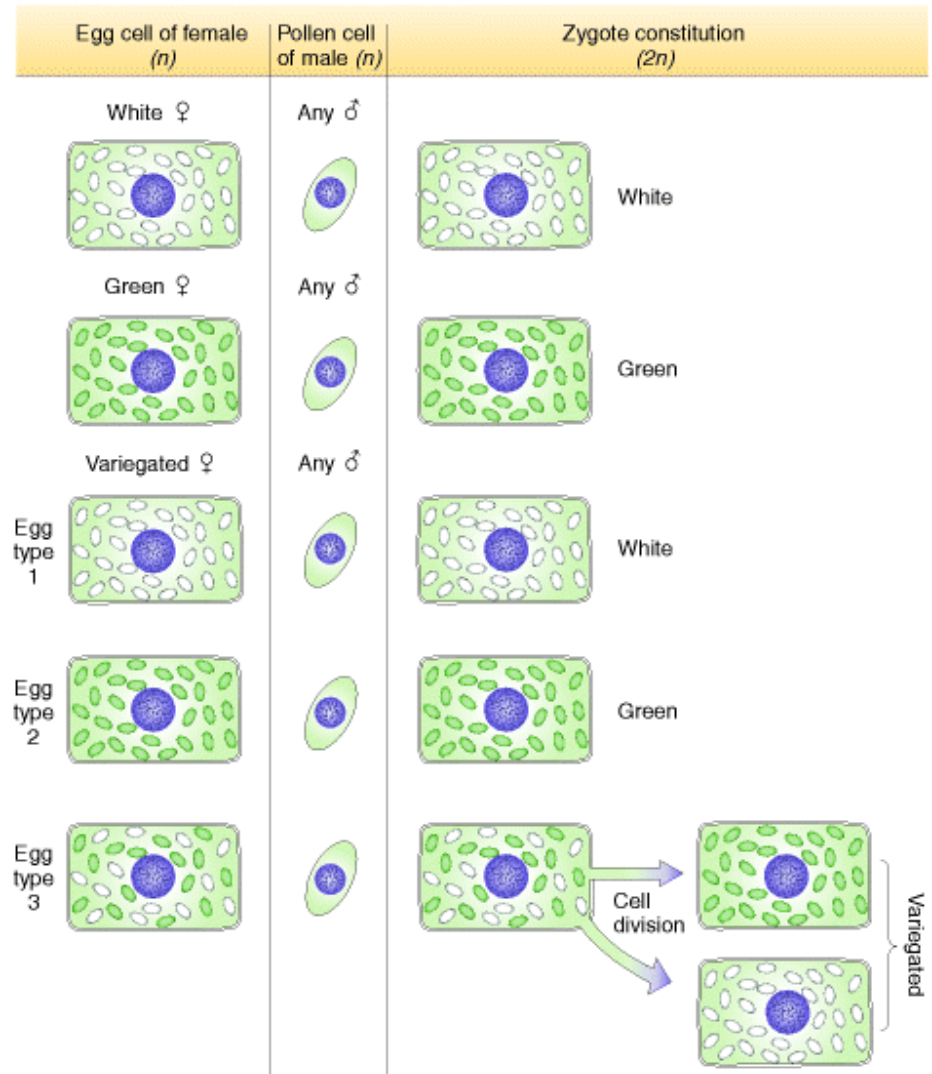
**¿Porqué?**

# Herencia de los cloroplastos

(a) Variegated Plant



(b) Results of crosses between branches



El organelo en la cigota proviene de la madre (óvulo) - tamaño

**Herencia maternal**

# Implicancias prácticas de la herencia maternal de los plastos

---

- Rasgos codificados en los plastos **no son transferidos fácilmente** a otras especies vegetales (en la formación de híbridos)
  
- Rasgos codificados en los plastos **no son presentes en el polen**, así disminuyendo su potencial 'riesgo' a especies no-vegetales no-blancos



# Herencia generacional de los plastos - excepciones

---

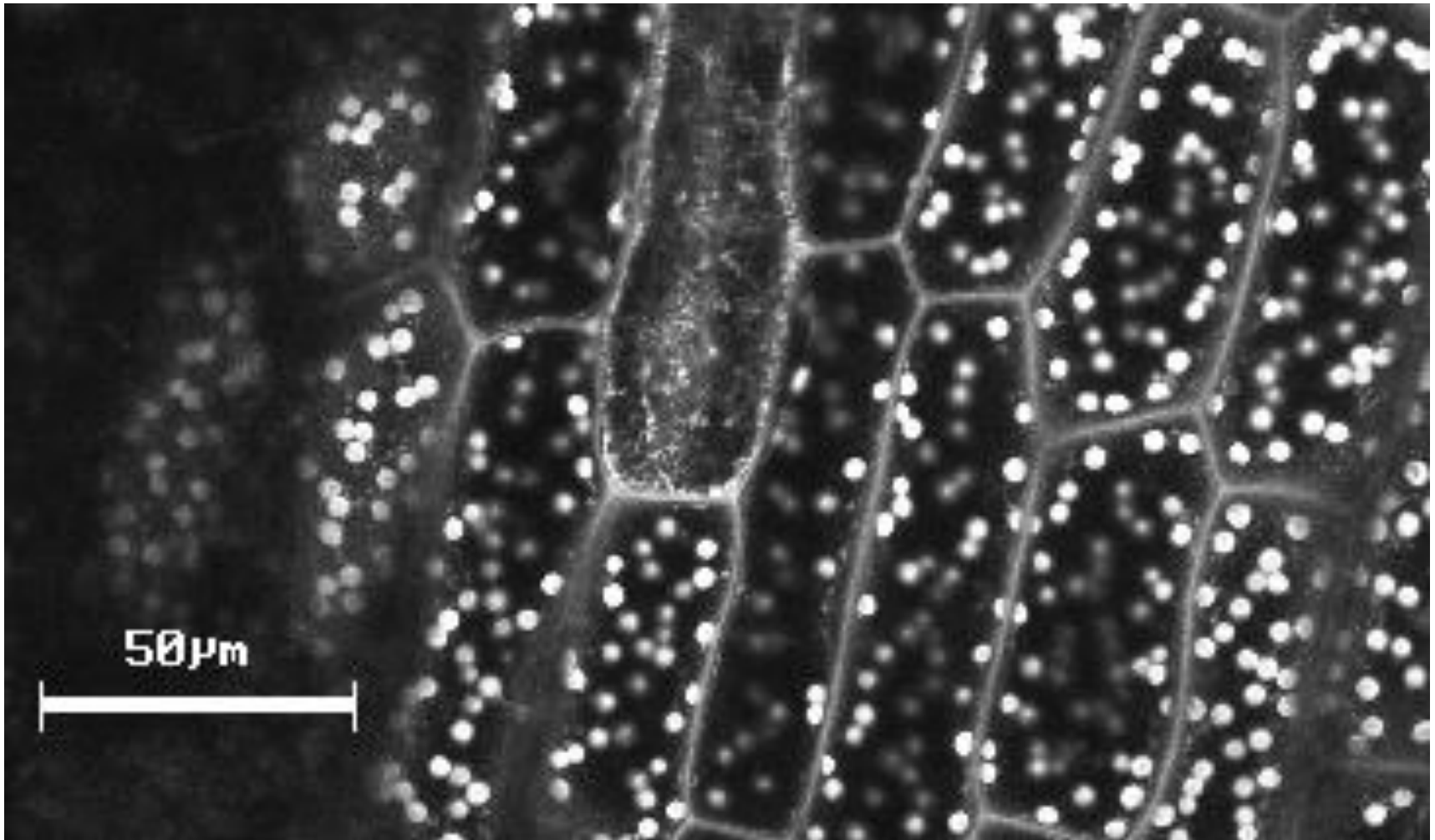
<b>Especie</b>	<b>Cloroplastos</b>
<b>Maíz (<i>Zea maiz</i>)</b>	<b>m</b>
<b><i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>m</b>
<b>Geranio (<i>Pelargonium</i> spp.)</b>	<b>m, m/p, p</b>
<b>Plátano (<i>Musa acuminata</i>)</b>	<b>m</b>
<b>Sequoia (gimnosperma)</b>	<b>p</b>

**m = Maternal**

**p = Paternal**

# Cada célula posee muchos (cloro)plastos

---



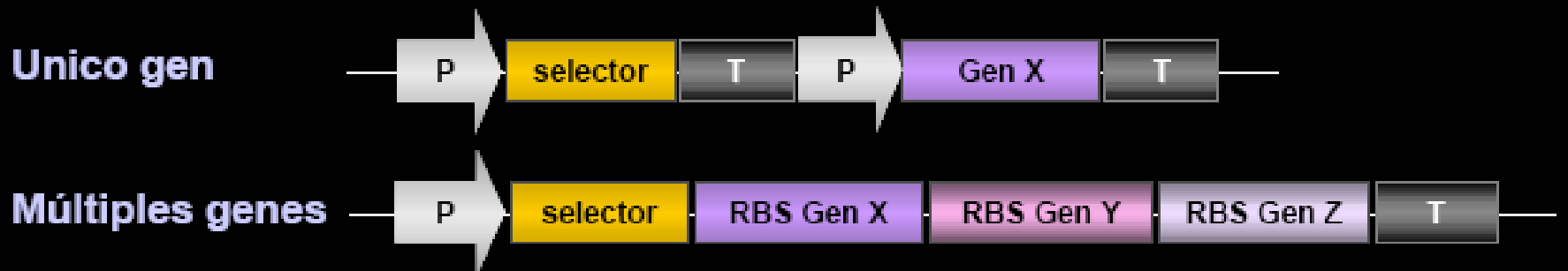
# Ventajas de poder transformar los plastos

Hemos visto...

- **Múltiples organelos por célula** **100**
- **Múltiples copia del DNA por organelo** **x 100**  
**copias por célula** **10000**
- **Herencia materna, fácil de contener**

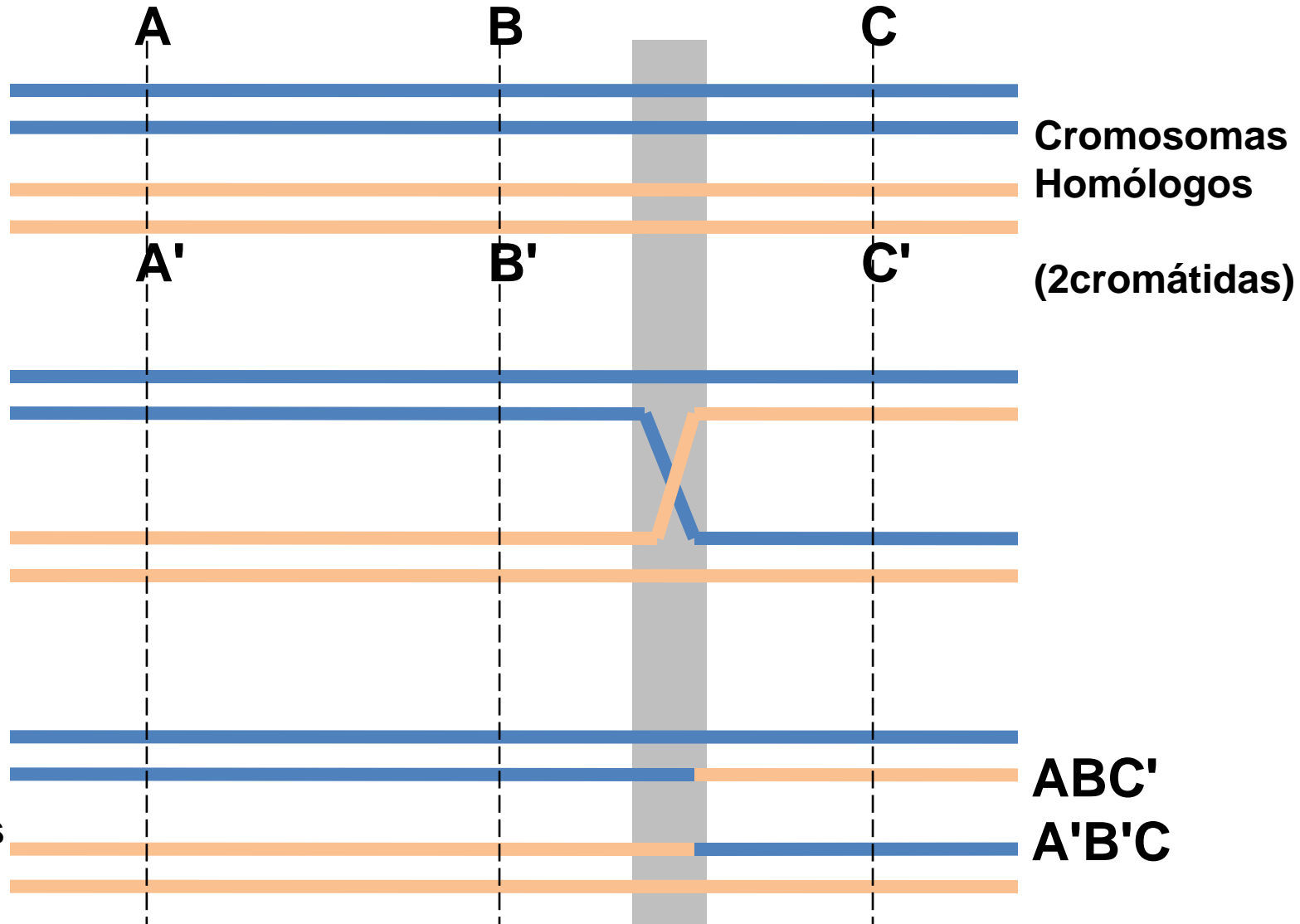
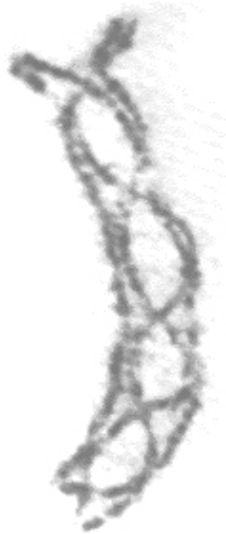
Además, su origen procarionte....

- **Genes transcritos en operones (un promotor, >1 gen)**



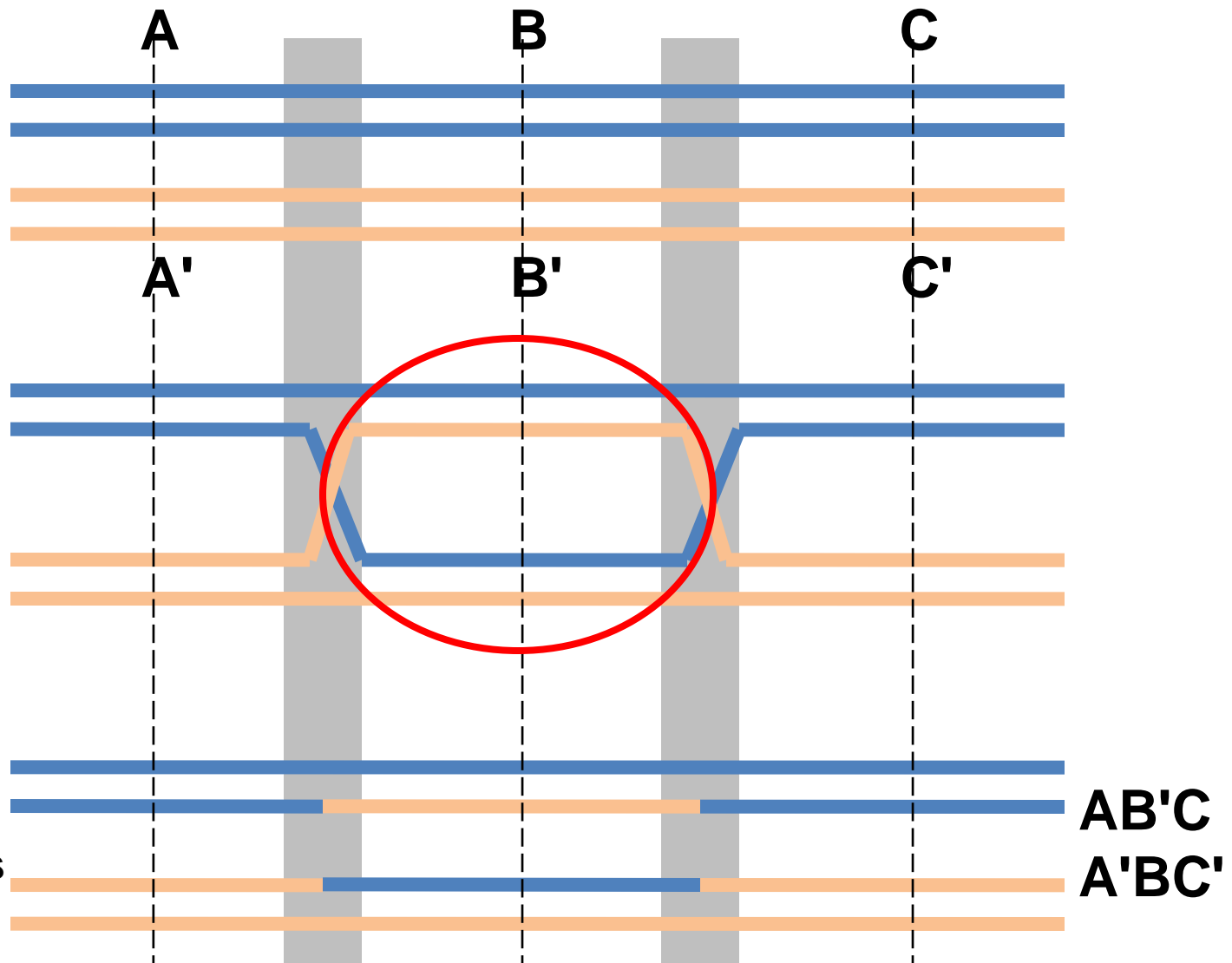
- Integración de transgen por **recombinación homóloga**

# Recombinación homóloga -ciasmata en meiosis



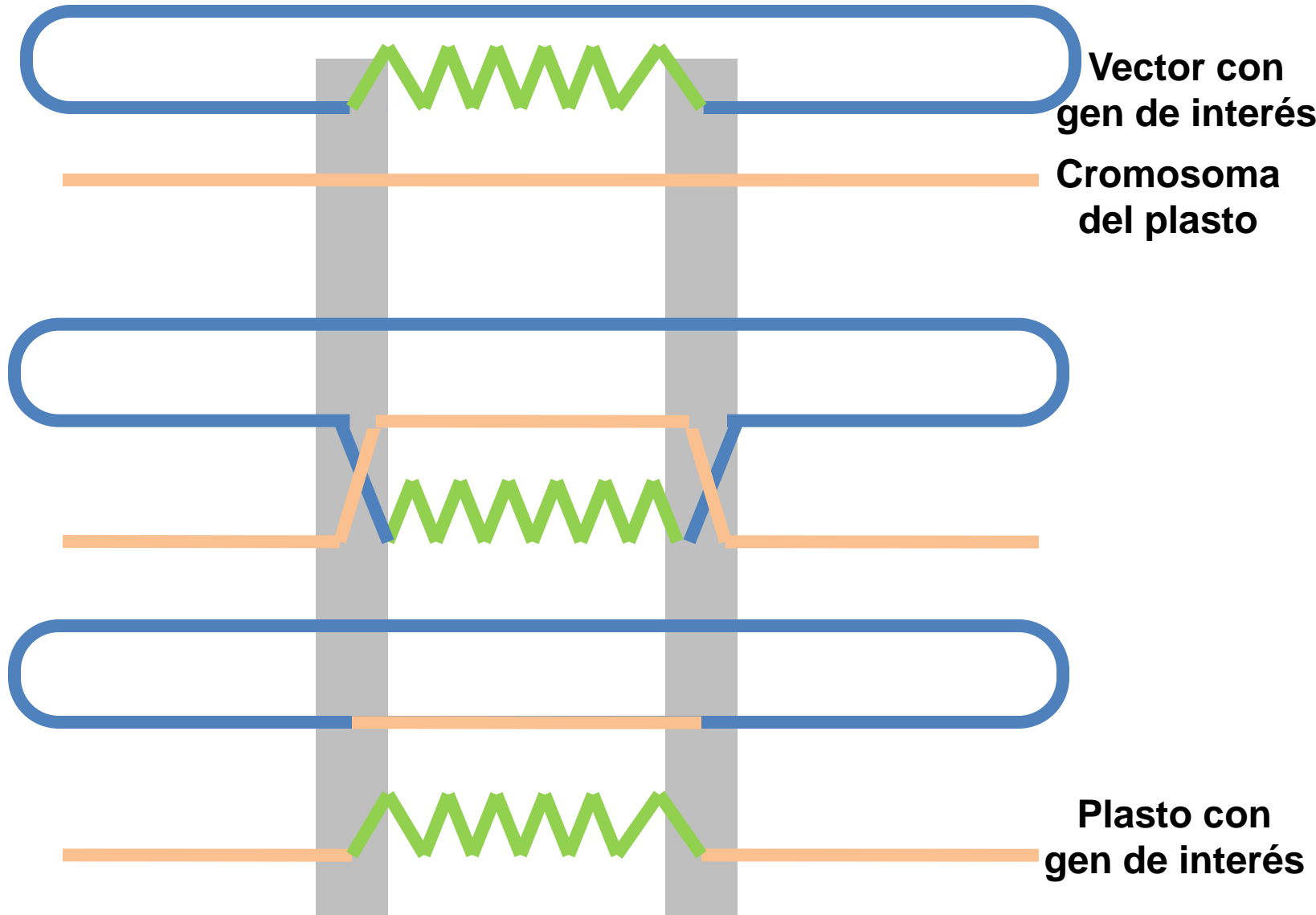


# Recombinación homóloga -doble ciasmata en meiosis



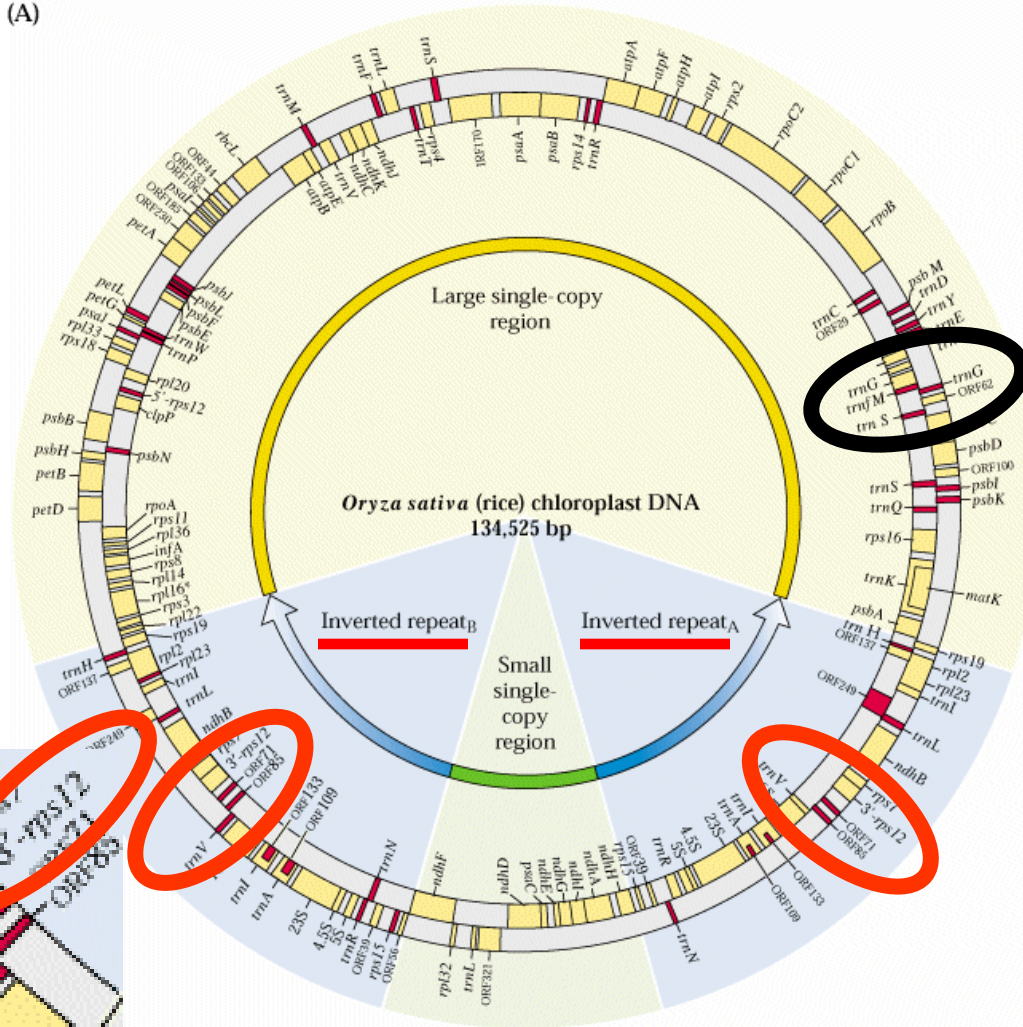
# Recombinación homóloga -transformación genética de plastos

---



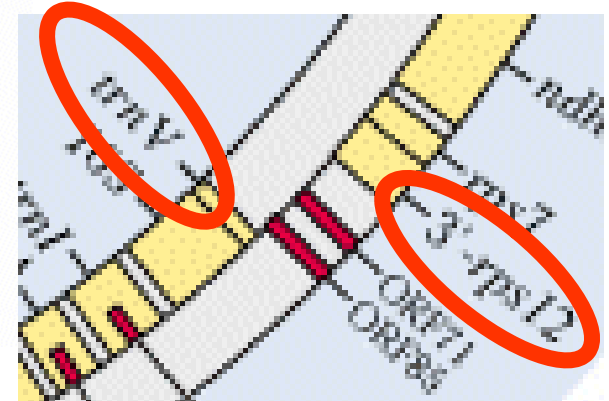
# Organización del genoma plastidial

(A)

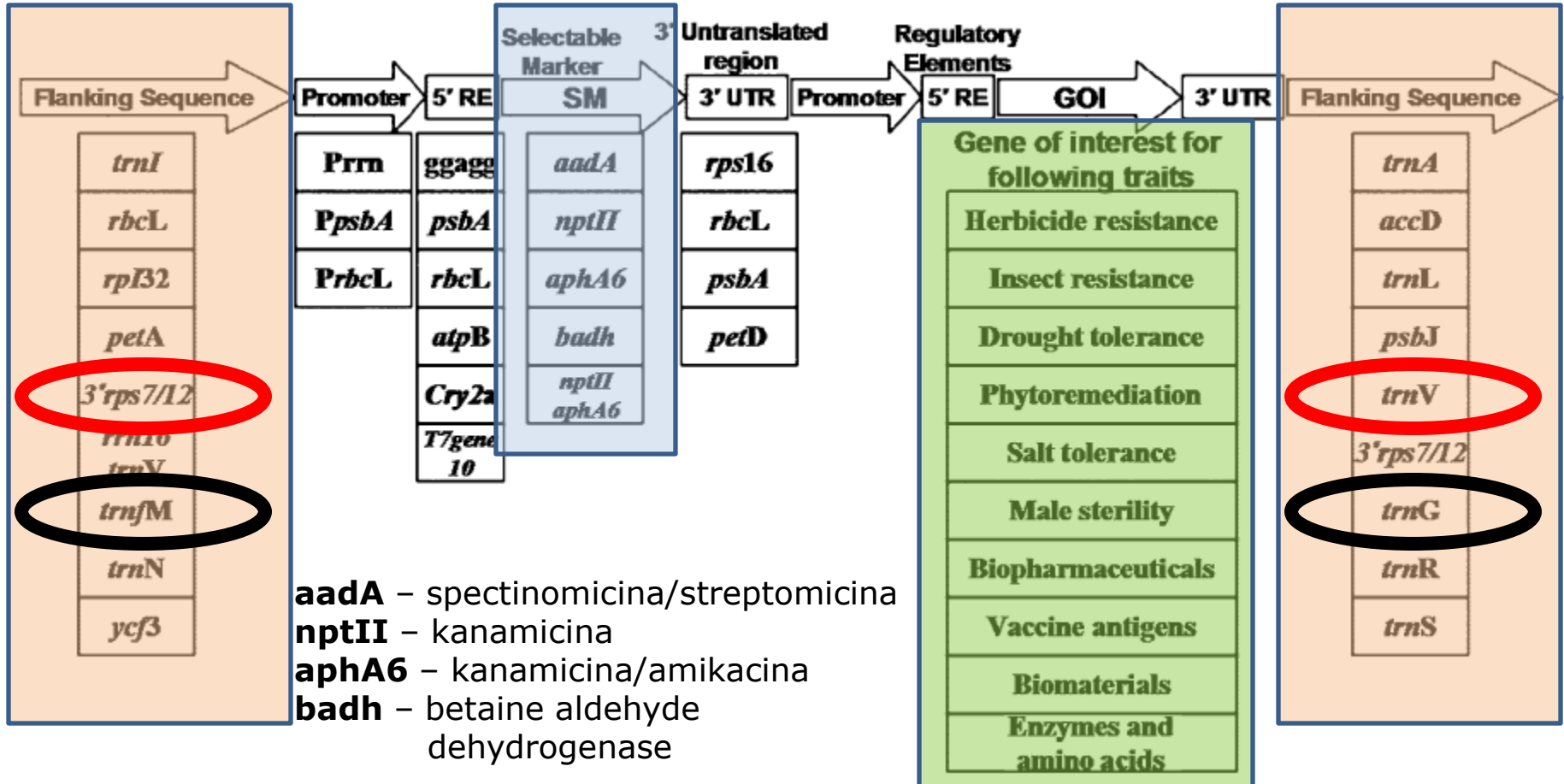


- ~35 genomas de cloroplastos de distintas especies secuenciados

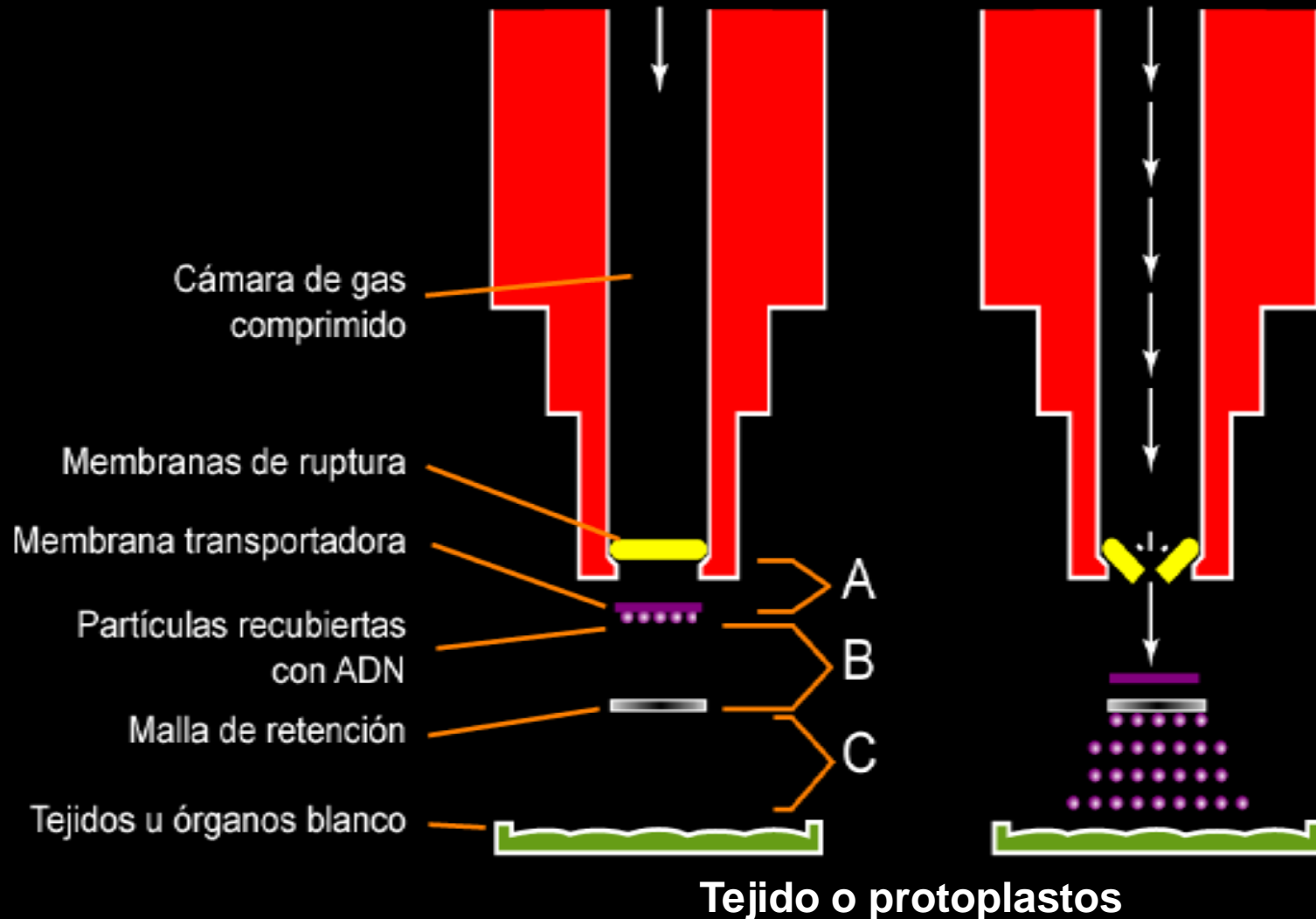
- regiones altamente conservadas



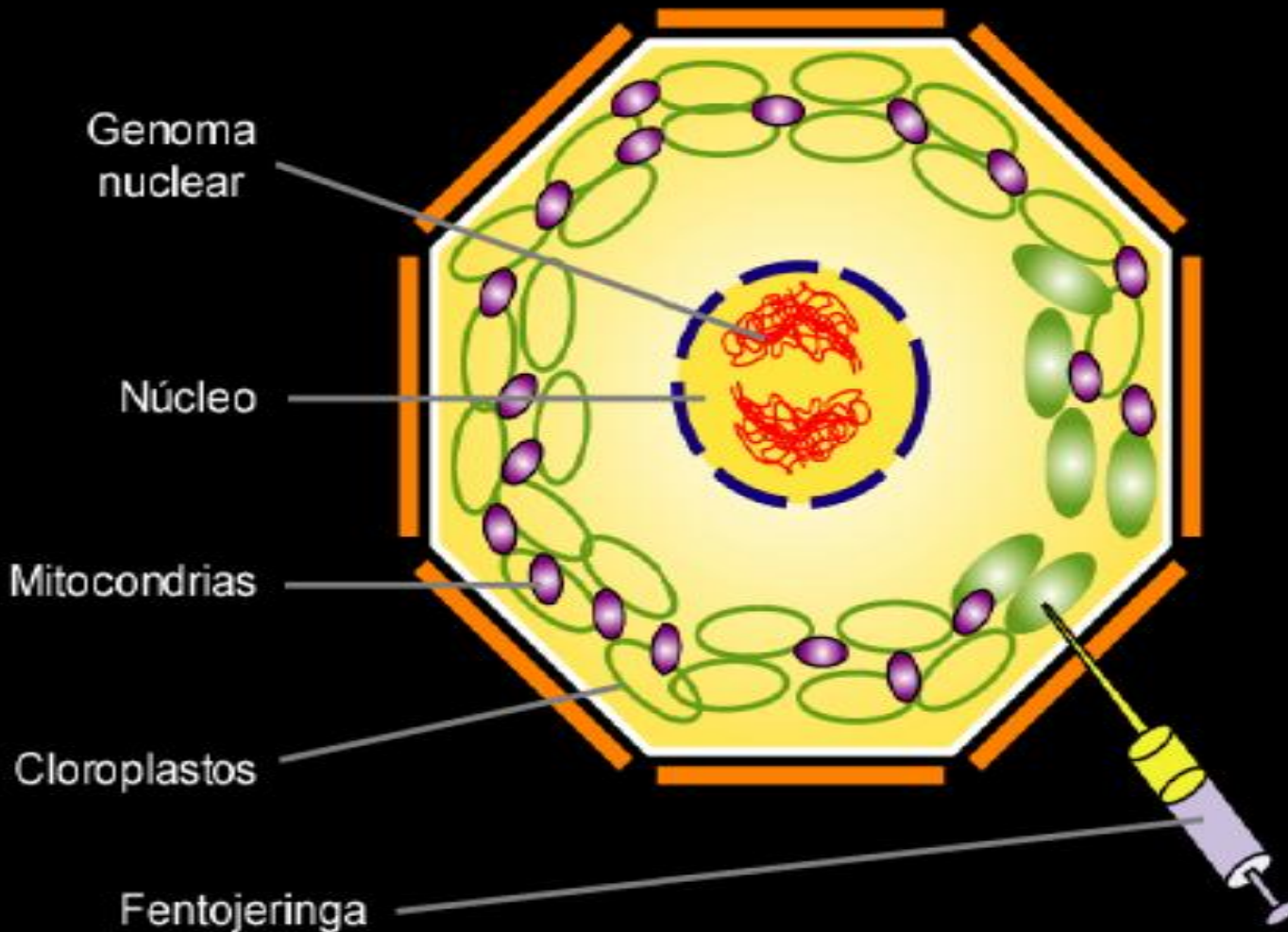
# Diseño de vectores para transformación de plastos



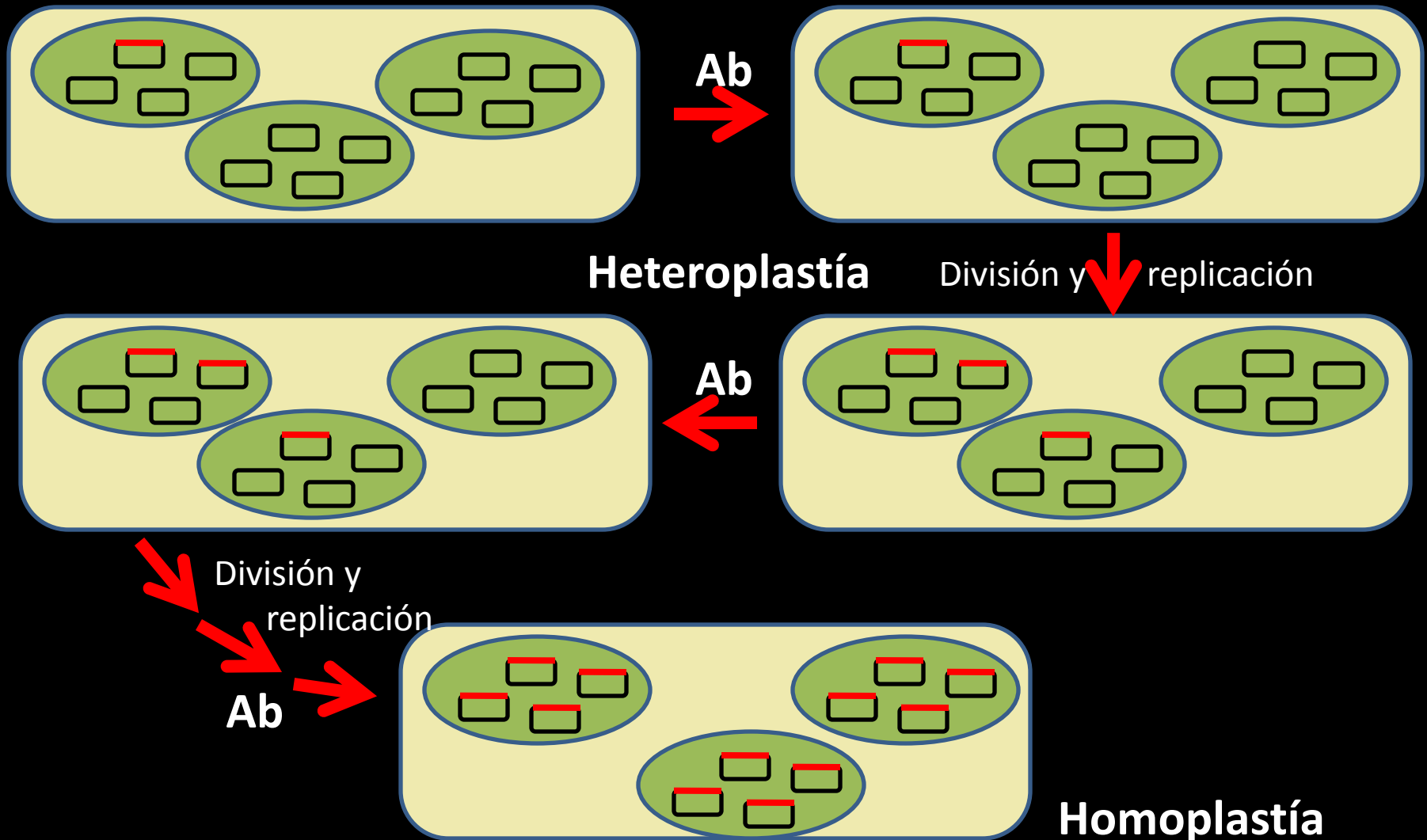
# Transformación de plastos -biobalística



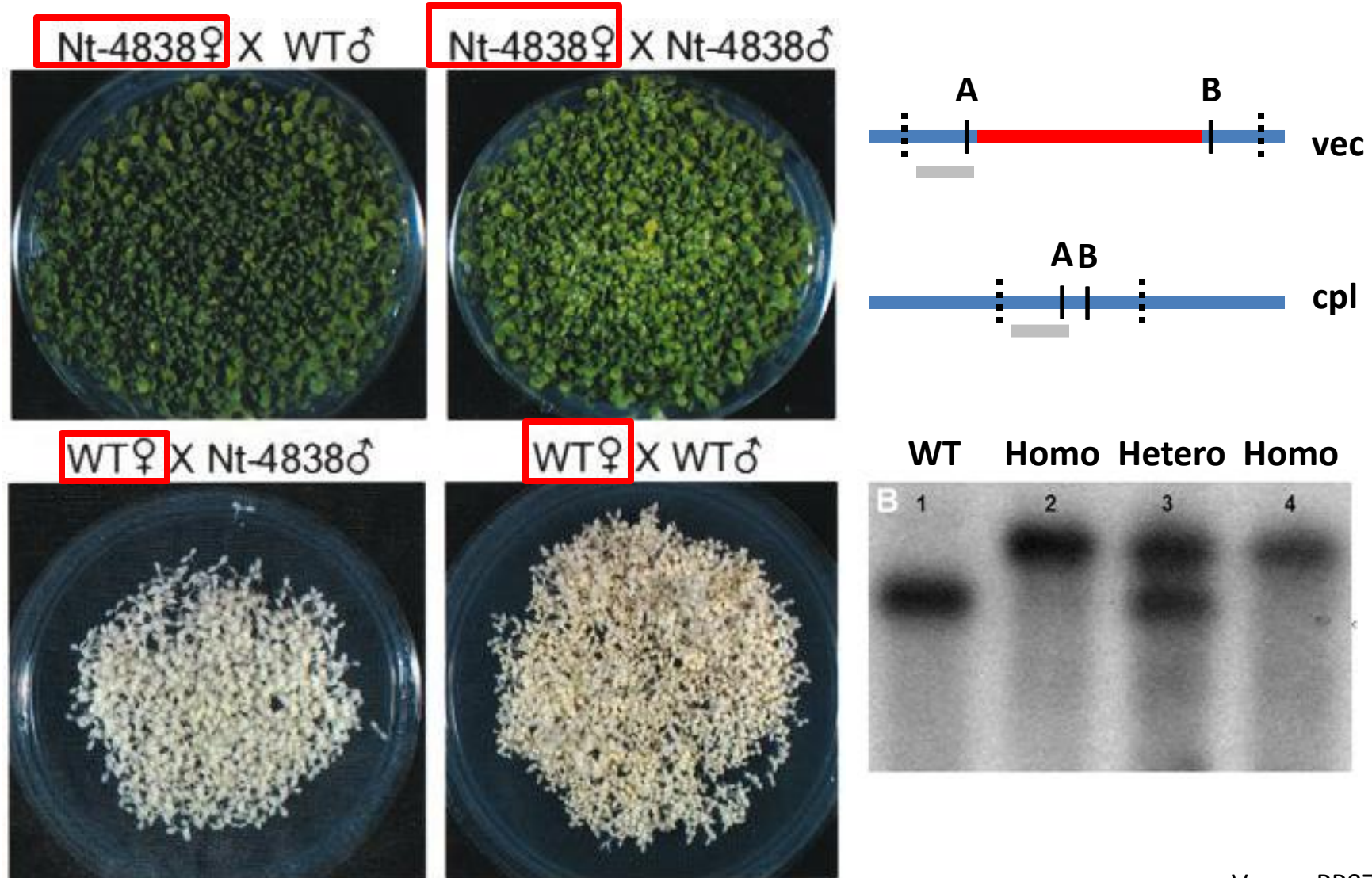
# Transformación de plastos -inyección



# Transformación de plastos -obtención de células homoplastías



# Comprobación de la herencia materna de los cloroplastos





# La transplastómica en especies vegetales

---

**Arroz**

**Zanahoria**

**Algodón**

**Lechuga**

**Coliflor**

**Raps**

**Soja**

**Petunia**

**Maíz**

**Tabaco**

**Papa**

# Algunos ejemplos de la transplastómica

---

## Rasgos agronómicos

- Resistencia a herbicida
- Producción de toxina Bt
- Resistencia a sequia

## Farmacéutico

- Producción de albumina sérica humana
- Producción de factores de crecimiento (FC; insulina-like) e interferonas

## Salud

- Producción de antígenos para vacunas ej Cólera, Ántrax, rotavirus, hepatitis C

## 'Biofarm '

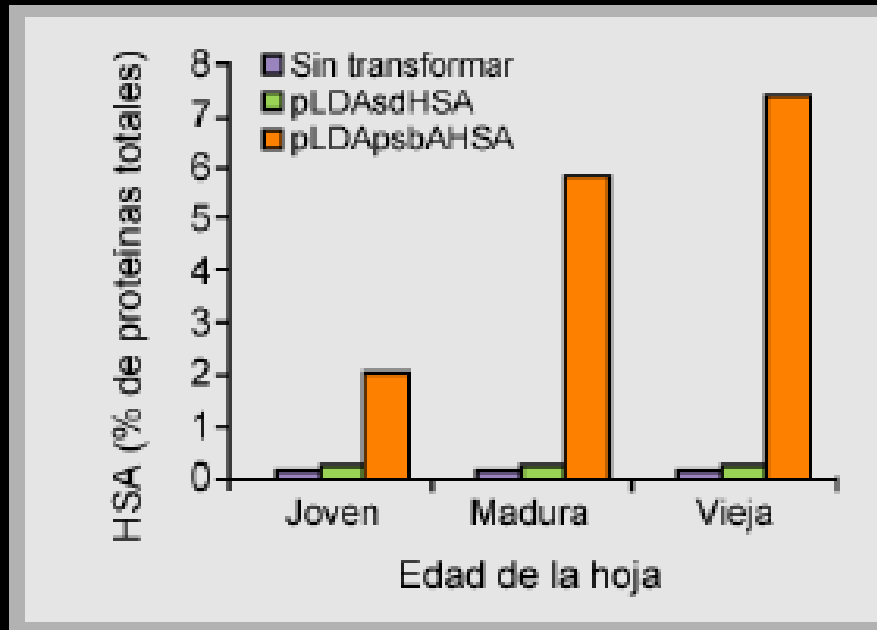
- barato,
- ausencia de patógenos de mamíferos
- alto rendimiento

# 1.- Producción de albumina sérica humana (ASH)

## ASH

- 60% del volumen total de suero
- Proteína mas usada en transfusiones
- Bajos niveles producidos en otros sistemas transgénicos

### Medición de HSA por ELISA en hojas de distintos estadios

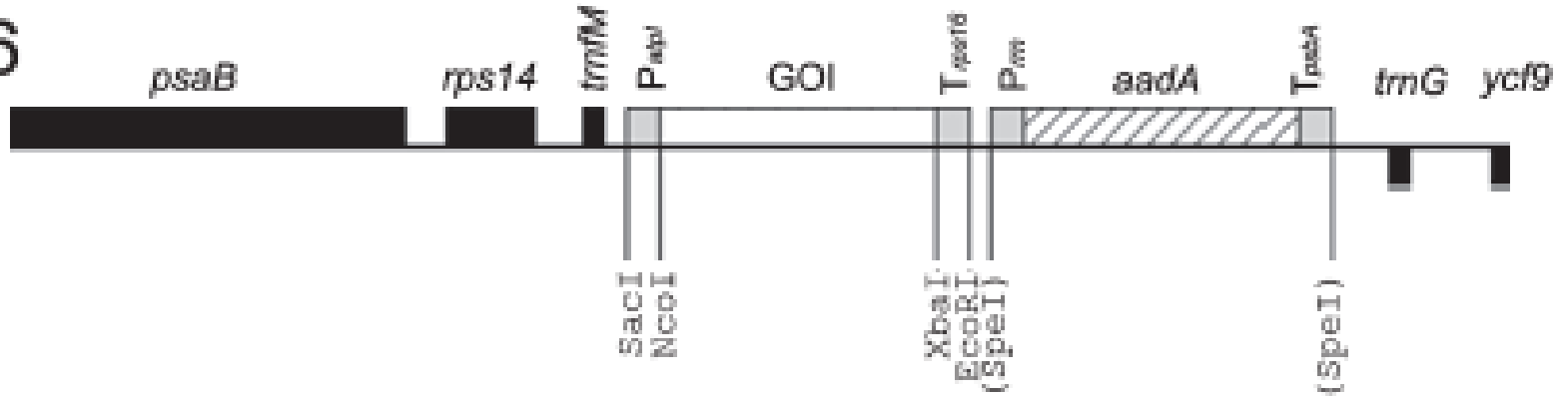


Tabaco 1, 2 - **wild-type**

Tabaco 3, 4 - **transformadas**

# 2.- Producción de tomates más naranjos 1

pRB96



GGPP



Fitoeno

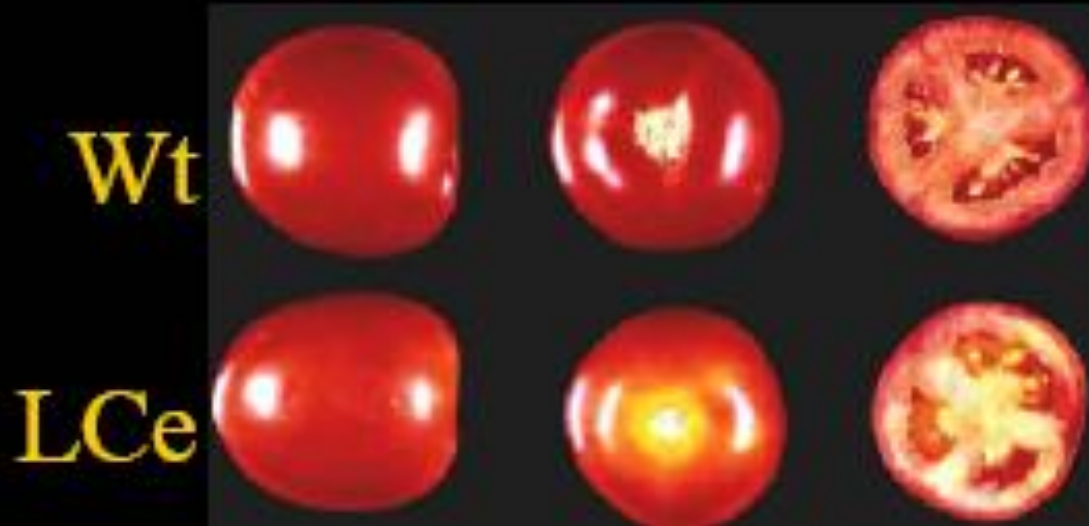


Z-caroteno → Licopeno → β-caroteno

Licopeno  
β-ciclasa



# 2.- Producción de tomates más naranjos 1



Wt

LCe

Licopeno  
β-ciclase

Licopeno → β-caroteno

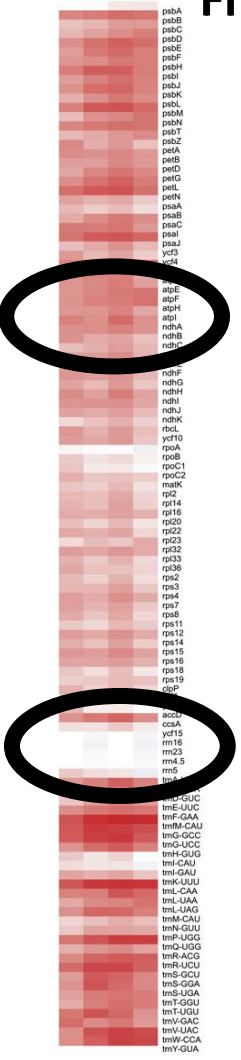
	WT	LC <sub>E</sub>
Neoxanthin	nd	nd
Violaxanthin	nd	nd
Antheraxanthin	nd	nd
Zeaxanthin	nd	nd
Chlorophyll b	nd	nd
Chlorophyll a	nd	nd
Lycopene	3657.4 ± 156.5	2951 ± 138.4
β-Carotene	69.1 ± 21.4	286.1 ± 14.6
Total carotenoid	3726.6 ± 159.7	3237.1 ± 151.6
Total chlorophyll	nd	nd

0.8x

4.1x

# 2.- Producción de tomates más naranjos-transcriptómica

A Fruto v hoja



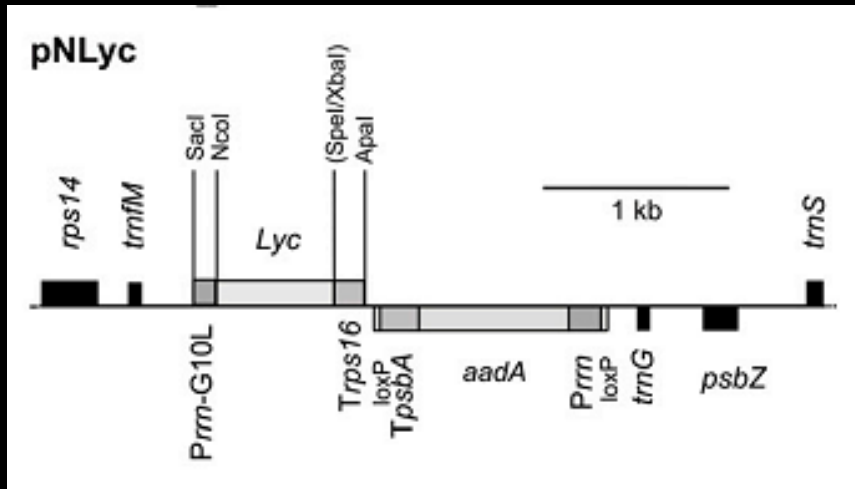
*atpI*



*rrn16*  
*rrn23*  
*rrn4.5*  
*rrn5*



# 2.- Producción de tomates más naranjos 2



*Narcissus pseudonarcissus* (daffodil)

**GGPP**



**Fitoeno**



**Z-caroteno** → **Lycopeno** → **β-caroteno**

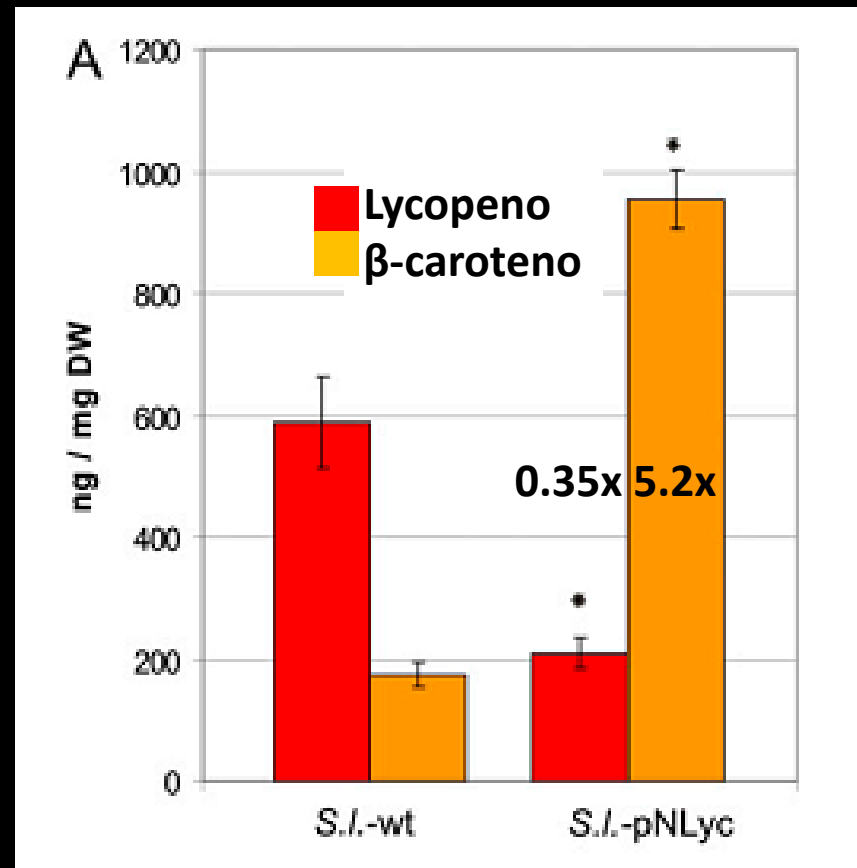
Lycopeno  
β-ciclase



# 2.- Producción de tomates más naranjos 2



Licopeno  
 $\beta$ -ciclasa  
Licopeno  $\longrightarrow$   $\beta$ -caroteno





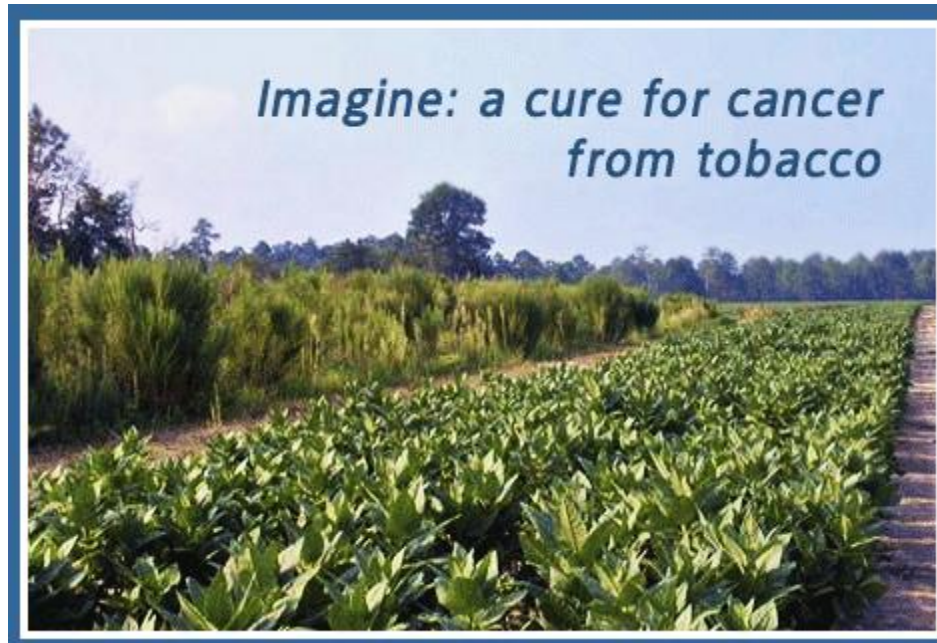
# Conclusiones

	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	TGS y PTGS afectan la expresión
Transferencia horizontal	Herencia materna	Sí
Plegamiento y formación de puentes disulfuro	Correcto	Correcto (pasando por retículo endoplasmático)
Glicosilación	NO	SI



# Chlorogen

*The future of protein production*



MONSANTO

