

Inducción de **raíces** transformadas de *Brassica oleracea var. italica* (**brócoli**) útiles para la producción de proteínas heterólogas con actividad terapéutica

Edgar García López *
Emma G. Ramos Ramírez *
Armando Ariza Castolo **
Josefina Pérez Vargas ***
Octavio Gómez Guzmán *
Graciano Calva Calva *



RESUMEN

En este trabajo se establecieron cultivos de raíces transgénicas de brócoli útiles para la transfección de genes foráneos vía *Agrobacterium rhizogenes*. Se encontró que 95% de plántulas de brócoli infectadas con *Agrobacterium* desarrollaron raíces aéreas en los puntos de punción, mostrando las características morfológicas y microscópicas típicas de las raíces transformadas. Los cultivos de raíces transformadas presentaron una velocidad de crecimiento de 1.14 cm/d y un incremento en peso seco de 12.4 g/l. Por otro lado, los cultivos de raíces no transformadas tuvieron un consumo de sacarosa de aproximadamente 60% y un aumento en el peso seco de 5.8 g por litro, después de 30 días, además de una velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) de 0.17 d⁻¹, con un tiempo de duplicación (Td) de 5.9 d.

Acerca de los autores...

* Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.
** Departamento de Química, CINVESTAV-IPN.
*** Posgrado en Ingeniería Bioquímica, TESE.

Las técnicas de cultivo de células, tejidos y órganos vegetales, ofrecen un gran potencial para la producción de proteínas heterólogas con actividades terapéuticas y de diagnóstico (Twyman 2003). De esas técnicas, las raíces transformadas o *hairy roots*, han demostrado ser un modelo biotecnológico adecuado para la expresión de proteínas, como la hormona de crecimiento e insulina humanas, u otras de origen microbiano con potencial actividad biológica (Danielle, 2001). Estas raíces transgénicas se obtienen por transfección de genes foráneos vía *Agrobacterium rhizogenes* usando vectores diseñados para trasladar y expresar el material genético foráneo en el genoma de las células infectadas con la bacteria (Tzfira, 2006).

Se encontró que un 95% de las plántulas infectadas con *Agrobacterium* desarrollaron raíces aéreas en los puntos de punción, mostrando las características morfológicas y microscópicas típicas de las raíces transformadas. Los cultivos de raíces transformadas mostraron una velocidad de crecimiento de 1.14 cm/d y un aumento en peso seco de 12.4 g/l. Por otro lado, los cultivos de raíces no transformadas presentaron un consumo de sacarosa de aproximadamente 60% y un aumento en el peso seco de 5.8 g por litro después de 30 días; además de una velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) de 0.17 d^{-1} , con un tiempo de duplicación (Td) de 5.9 d.

MATERIALES Y MÉTODOS

Transformación de *E. coli* y *A. rhizogenes*

La transformación de *E. coli* DH5 α y *A. rhizogenes* LBA9402 se realizó usando el mismo protocolo. Se prepararon células electrocompetentes y se transformaron por electroporación a 2.5 kV, 5 ms, y 200 Ω , en presencia de los vectores correspondientes, según el propósito del experimento en turno. Las células electroporadas se incubaron en un ml de medio LB sin antibiótico por tres horas antes de ser plaqueadas en cajas Petri con medio de cultivo LB, adicionado con el antibiótico de selección: ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) para las transformadas con pBS, y estreptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$), para las transformadas con pCAMBIA 1105.1 (pC1105.1).

La introducción de los vectores “a” se hizo con las mismas condiciones que para las células de *E. coli* DH5 α .

MATERIAL VEGETAL

Germinación. Semillas de brócoli fueron embebidas por 20 minutos en agua destilada estéril. Se lavaron tres veces con dicha agua y se colocaron en alcohol etílico al 70% por 30 segundos. Se lavaron tres veces más con agua destilada estéril y se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5-7% (Cloralex^{MR}) por 15 minutos, con agitación periódica. Por último, se lavaron tres veces más con esa agua y se recolectaron en una caja Petri estéril para su siembra en cámaras de cultivo de 125 ml, con 30 ml de medio de cultivo B5. Los frascos se mantuvieron en un cuarto de incubación con temperatura controlada entre 25 y 27 °C e iluminación continua a 5400 lux. Las plántulas de una semana de edad fueron utilizadas para la inducción de raíces transformadas.

INDUCCIÓN DE RAÍCES TRANSFORMADAS

Las raíces transformadas se indujeron mediante la infección de hipocotilos por punción, a un centímetro debajo de los cotiledones, en plántulas de brócoli de una semana de edad sin hojas verdaderas, con una aguja hipodérmica infestada con una suspensión de 48 horas de crecimiento exponencial de *A. rhizogenes* silvestre, o transformada con los vectores adecuados. Los cultivos con las plántulas infectadas fueron mantenidos a 25-27 °C, con iluminación constante de 5400 lux, por 15 días o hasta la aparición de raíces pilosas en el punto de punción. Algunas plántulas fueron punzadas con agua estéril como controles.

ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS Y NO TRANSFORMADAS

El tejido radical de plantas no inoculadas con *Agrobacterium* fue retirado de las plántulas de aproximadamente una semana de edad y se colocaron para su propagación en matraces con medio Shenck & Hildebrandt (SH) adicionado con 30 g/l de sacarosa.

Las raíces de 2-3 cm de longitud potencialmente transformadas, emergidas en los puntos de punción en plántulas infectadas con *Agrobacterium*, fueron escindidas de los tallos y colocadas en frascos con medio SH semisólido, adicionado con cefotaxima (400 µg/ml) para eliminar la bacteria. Cuando estas raíces alcanzaron 10 cm de longitud, fueron transferidas a matraces Erlenmeyer con 30 ml de medio SH líquido, adicionado con el mismo antibiótico, y que se mantuvieron en una agitadora orbital a 110 rpm y 26° C.

CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR QUIMÉRICO pCAMHGHE

Se amplificó por PCR (Techne TC-312) la región correspondiente al cDNA de la hormona de crecimiento humano (HGH) con los iniciadores 5'- tggctctcatgggtaaaacgacggccagt-3' y 5' - tgg-tctccgatctcaggaaca- gctatgac-3'. Éstos contienen la región para la enzima de restricción Eco3II además de los correspondientes a BglII y NcoI. El amplificado fue digerido con Eco3II y purificado de la banda en un gel de agarosa, para su posterior ligación al vector pCAMBIA1105.1 (pCI105.1) con extremos cohesivos correspondientes a NcoI y BglII.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación de *A. rhizogenes* LBA9402 con el vector pCI105.1

Las colonias de *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402 positivamente transformada con el vector pCI105.1, crecieron adecuadamente en presencia de la estreptomycin (Figura 1A) sugiriendo la presencia del DNA plasmídico (12.1 kb), que se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (Figura 1B).

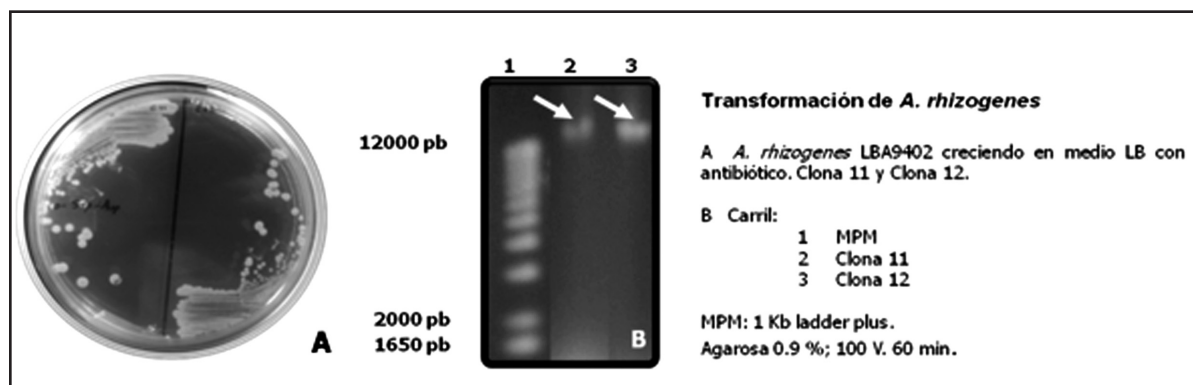


Figura 1. Colonias de *A. rhizogenes* 9402 transformadas de con el vector pCI105.1 y crecidas en presencia de estreptomycin (A) y gel de agarosa mostrando la presencia de las bandas correspondientes al vector en dos de las clonas (B).

INDUCCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE BRÓCOLI

Un 95% de las plántulas infectadas con *Agrobacterium* desarrollaron raíces aéreas y pilosas en los puntos de punción, mostrando las características morfológicas y microscópicas típicas de las raíces transformadas: ageotropismo positivo, rápido crecimiento, alta ramificación y vellosidad abundante (Figuras 2 A, B y C).

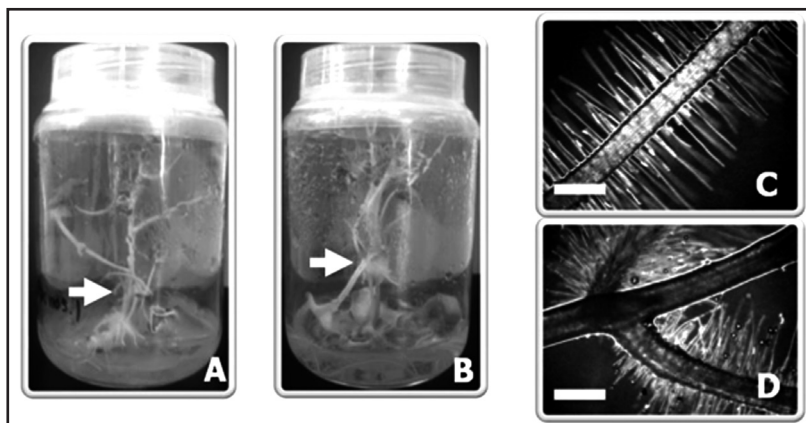


Figura 2. Inducción de raíces aéreas en plántulas de brócoli y microfotografía de raíces transformadas con *Agrobacterium* LBA9402 silvestre que contiene el vector pRi 1855 (A), y con *Agrobacterium* LBA9402 transformada con el vector pC1105.1 (B). Las microfotografías en C y D muestran raíces pilosas primarias y secundarias transformadas típicas (Barra 600 μm).

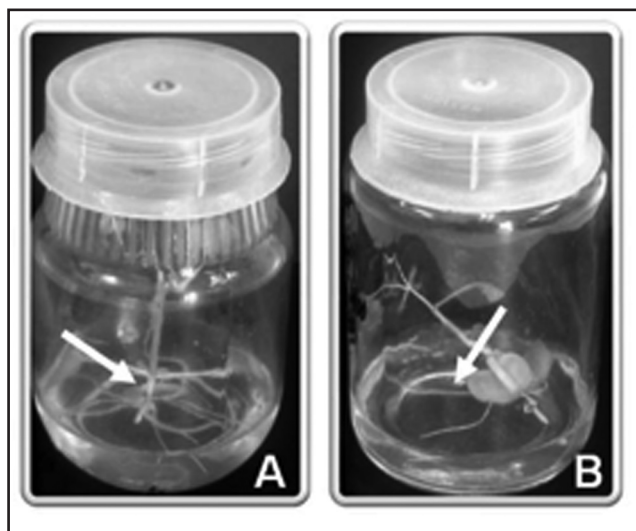


Figura 3. Elongación de raíces transformadas aéreas (flechas) en plántulas truncadas y transplantadas a medio SH. Las plántulas se infectaron con *A. rhizogenes* transformado con el plásmido pC1105.1 (A), y con *A. rhizogenes* LBA9402 silvestre llevando el plásmido pRi 1855 (B).

Con el fin de que las raíces transformadas proliferaran y tomaran el tamaño adecuado para sobrevivir separadas de la planta, ésta se retiró del medio de cultivo y la parte aérea sin raíz verdadera se transplantó a un medio semisólido de Shenck y Hildebrandt (SH), adicionado con cefotaxima (400 $\mu\text{g/ml}$) para evitar el crecimiento de la bacteria. Todas estas plántulas truncadas transplantadas produjeron nuevas raíces sumergidas, presumiblemente sin transformar, y permitieron el adecuado desarrollo de las raíces transformadas aéreas en el punto de punción hasta 8-10 cm en sólo una semana (Figuras 3 A y B).

Una vez que las raíces alcanzaron 8 a 10 cm de longitud, fueron cortadas del resto de la planta y se sembraron en matraces con medio SH líquido, con cefotaxima (Figuras 4 A y B). Estos cultivos de raíces transformadas mostraron velocidad de crecimiento de 1.14 cm/d y un incremento de 14.3 g PS/l en 17 días.

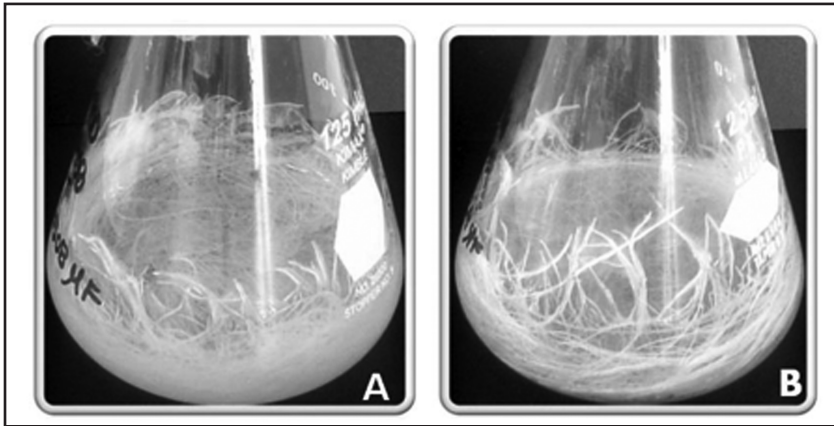


Figura 4. Raíces transformadas con *A. rhizogenes* silvestre llevando el plásmido pRi 1855 (B), y con *A. rhizogenes* transformado con el vector pCI 105.1 (A).

PERFIL DE CRECIMIENTO DE RAÍCES NO TRANSFORMADAS

Con propósitos de comparación, en paralelo se establecieron cultivos de raíces no transformadas utilizando explantes de tejido radical de plántulas no infectadas con *Agrobacterium*. En estos cultivos se siguió la cinética de crecimiento monitoreando la variación en el peso fresco, peso seco y consumo de sacarosa por el método del ácido dinitrosalicílico (Figura 5).

De esta manera, de acuerdo con el modelo de Monod, la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) para los cultivos de raíces no transformadas fue de 0.17 d⁻¹, con un tiempo de duplicación (Td) de 5.9 días. Estos cultivos mostraron un consumo de sacarosa de aproximadamente 60% y un incremento en el peso seco de 5.8 g por litro después de 30 días.

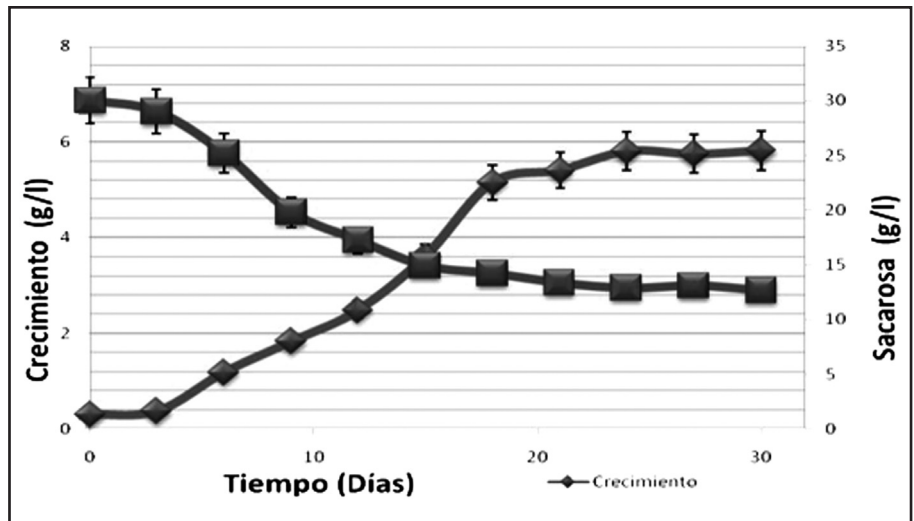


Figura 5. Perfil de crecimiento y consumo de sacarosa en cultivos de raíces no transformadas

Si bien es cierto que aún no se puede hacer una comparación entre los parámetros cinéticos de los cultivos transformados con los no transformados, se pueden confrontar los índices de crecimiento. Para los cultivos no transformados se alcanzó 5.8 g PS/l en 30 días, mientras que para los cultivos transformados se obtuvo 14.3 g PS/l en 17 días. Estos datos permiten inferir que los cultivos transformados poseen una velocidad específica de crecimiento superior a la mostrada por los cultivos normales.

PERFIL DE SACAROSA, GLUCOSA Y FRUCTOSA EN MEDIO DE CULTIVO

Al seguir el perfil de consumo de sacarosa en el medio de cultivo por raíces no transformadas, evaluando también glucosa y fructosa por HPLC/IR (Figura 6), se pudo observar la desaparición de sacarosa y la aparición de glucosa y fructosa desde la fase lag y durante la fase exponencial. Este cultivo, como el de la Figura 5, alcanzó la etapa estacionaria con poco más de la mitad de los azúcares consumidos, muy probablemente debido a la falta de espacio en el matraz (Figura 4). Sin embargo, la sacarosa se agota del medio de cultivo al final, pero la glucosa y fructosa mantienen una concentración residual de aproximadamente 5 g/l cada una, lo cual concuerda bien con la cantidad de sacarosa residual (12 g/l) observada en la cinética de la Figura 5.

La presencia de glucosa y fructosa no se pudo observar en la cinética mostrada en la Figura 5, debido a que el método del ácido dinitrosalicílico usado para ese estudio, evalúa azúcares totales sin distinguir entre sacarosa y sus monómeros. Esta observación resulta relevante para el presente proyecto, porque demuestra que estos cultivos son capaces de excretar proteínas estables al medio de cultivo, tal como la invertasa que hidroliza la sacarosa

en sus monómeros. Este hecho podría ser una ventaja si se piensa que esta fuente de carbono puede ser dirigida a la síntesis de proteína o material genético, favoreciendo la producción de proteínas heterólogas.

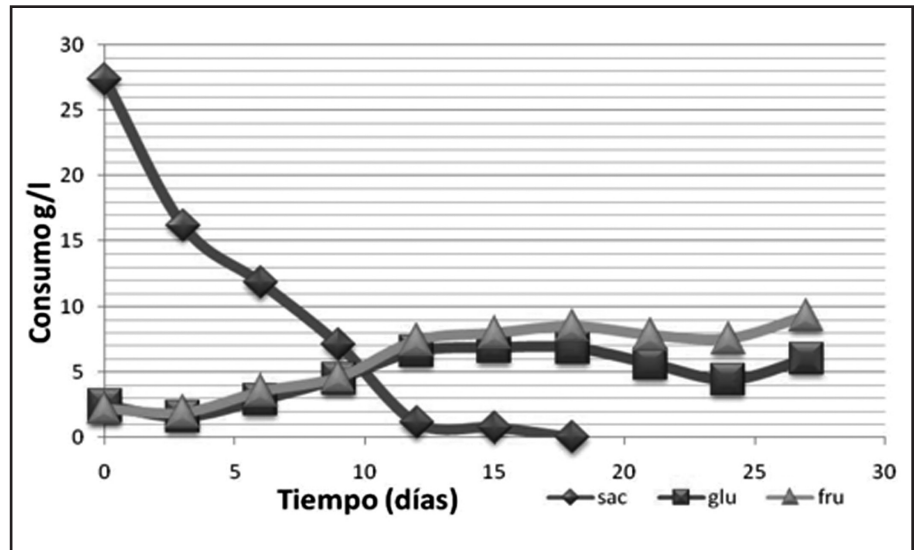


Figura 6. Perfil de sacarosa, glucosa y fructosa en medio de cultivo de los cultivos de la cinética de crecimiento de raíces no transformadas.

CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR QUIMÉRICO pCAMhGHE

Amplificación del cDNA de hGHI

El cDNA de la proteína hormona de crecimiento humano de 822 pb (gentilmente donado por la doctora Herminia G. Martínez, de la UANL) fue amplificado utilizando los iniciadores diseñados especialmente para tal secuencia, modificando los sitios de restricción flanqueantes (5'- tggctctcatgggtaaacgacggccagt-3' y 5'- tggctctccgatctcaggaaacagctatgac-3'). Tales iniciadores, incluyen en su secuencia un sitio de restricción separadamente a los de interés (NcoI y BglII), Eco31I. Dicha estrategia fue adoptada por la cualidad de la enzima para realizar cortes en las secuencias inmediatas a la secuencia de reconocimiento en la dirección 3' (Figura 7), generando así los dos extremos cohesivos en una sola reacción de



Figura 7. Sitio de reconocimiento de Eco31I

Durante la amplificación por PCR, se probó la adición del agente caotrópico Dimetilsulfóxido (DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) al 2, 3 y 5% de la mezcla de reacción. El DMSO tiene la capacidad reducir la estabilidad de las estructuras secundarias de los cebadores, favoreciendo la correcta hibridación (Figura 8). Como se puede observar en la Figura 8, la adición del agente caotrópico no mostró efecto importante sobre la amplificación, al no haber diferencias significativas entre las bandas amplificadas a distintas concentraciones de DMS.

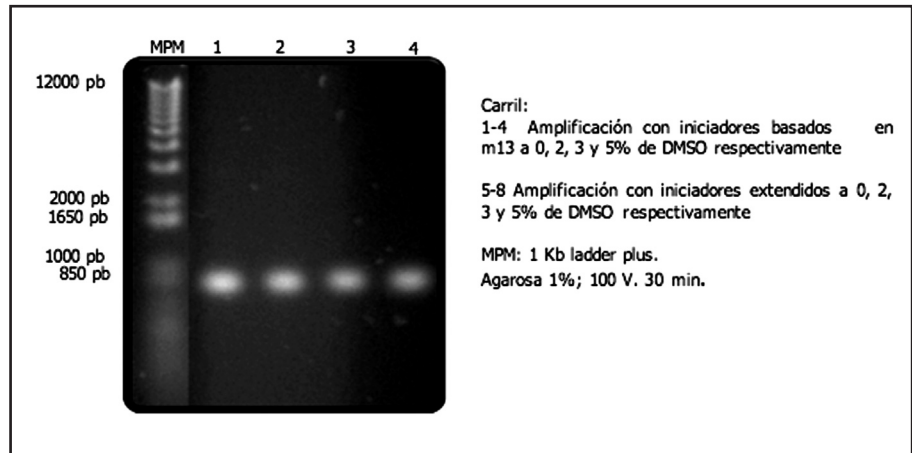


Figura 8. Amplificación del cDNA de hGHI con los iniciadores extendidos.

LIGACIÓN DEL AMPLIFICADO AL pC1105.1 DIGERIDO

Los productos de PCR fueron purificados de geles de agarosa, seguida de la cuantificación de su concentración, para después ser digeridos con la enzima Eco3II y generar los extremos cohesivos de NcoI y BgIII. Paralelamente, se digirió el vector pC1105.1 con NcoI y BgIII de manera secuencial posterior a su purificación.

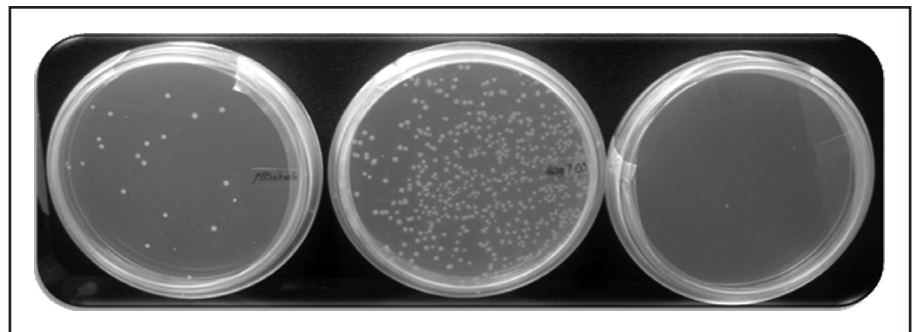


Figura 9. A) Colonias resultantes de la integración de moléculas recombinantes (pCAMhGHE); B) Control positivo de ligación; C) Control negativo de transformación.

Con los fragmentos de DNA digeridos, y en una proporción 3:1 en peso inserto – vector, se procedió a realizar la reacción de ligación probando 0.1, 0.5 y 1 Unidad de enzima ligasa (T4 DNA Ligase). Tras la ligación, se procedió a electroporar células competentes de *E. coli* DH5 α con la reacción de ligación para seleccionar clonas con las moléculas recombinantes generadas.

En los experimentos, fueron incluidos controles positivos y negativos de ligación (Figura 9). Como puede observarse, los controles positivos y negativos resultaron como se esperaba. En las placas correspondientes a las ligaciones de pCI105.1 y cDNA de hGHI (pCAMhGHE) se obtuvieron en promedio 10 colonias por placa. Tales colonias fueron sembradas individualmente en medio LB fresco con antibiótico (Estreptomocina 100 μ g/ml) y 16 fueron usadas para extraer DNA plásmidico para un primer escrutinio, al buscar bandas en geles de agarosa, de aproximadamente 13 Kb.

Seleccionadas dos colonias, este DNA se utilizó como templado de PCR, para confirmar la presencia del inserto dentro del vector quimérico generado, utilizando los iniciadores antes citados (Figura 10). Estas colonias son las empleadas para el establecimiento de raíces transformadas, productoras de la hormona del crecimiento humano.

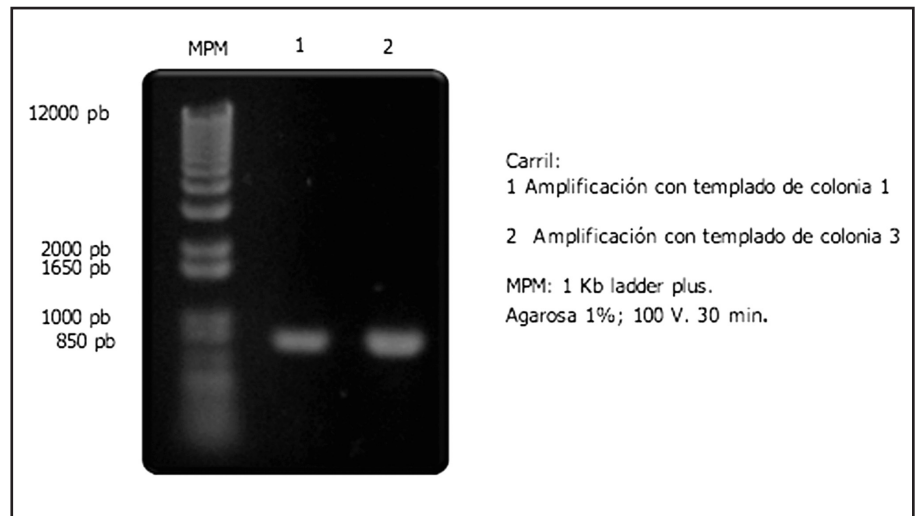


Figura 10. Amplificación del cDNA de hGHI del vector pCAMhGHE

CONCLUSIONES

En esta parte del trabajo, se desarrollaron los protocolos para el establecimiento de cultivos de raíces de brócoli, tanto transformadas como no transformadas. Los datos para los cultivos de raíces no transformadas indican un crecimiento más bajo (IC 5.8g de PS/l), en comparación con lo observado para los de raíces transformadas (IC 12.4g de PS/l). El desarrollo acelerado de los cultivos transformados sugiere que el modelo de brócoli es un sistema prometedor para la producción de proteínas heterólogas y, según el consumo de sacarosa, quizá con bajas necesidades nutrientes.

Se construyó el vector quimérico pCAMGHE (pCAMBIA 1105.1 + el cDNA del gen I de la hormona de crecimiento humano) que será transfectado a brócoli vía *A. rhizogenes*, para probar si este modelo vegetal es adecuado para la producción de proteínas heterólogas.

Bibliografía...

- Daniell H., Stephen J., Streatfield, Wycoff K. (2001). "Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants". *Elsevier Science Ltd*. Vol. 6, 219-226.
- Twyman R., Stoger E., Schillberg S., Christou P, Fischer R. (2003). "Molecular farming in plants: host systems and expression technology". *Elsevier Science Ltd*. Vol. 21, 570-578.
- Tzfira T., Citovsky V. (2006). "Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology". *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 17. 147-154.