

## PROTECCIÓN FRENTE A *PLUM POX VIRUS* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *NICOTIANA BENTHAMIANA* QUE EXPRESAN ANTICUERPOS RECOMBINANTES CONTRA PROTEÍNAS DEL VIRUS

M. Gil<sup>1</sup>, O. Esteban<sup>1</sup>, L. Peña<sup>1</sup>, J.A. García<sup>2</sup> y M. Cambra<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). 46113 Moncada (Valencia), España.

<sup>2</sup>Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Campus de la Universidad Autónoma, CSIC, 28049 Cantoblanco (Madrid), España.

### INTRODUCCIÓN

*Plum pox virus* (PPV) o virus de la sharka produce importantes daños y pérdidas económicas en frutales de hueso. En este trabajo se propone probar una nueva y prometedora estrategia de resistencia a la enfermedad de la sharka basada en el uso de anticuerpos recombinantes. La expresión constitutiva de genes o fragmentos de genes de anticuerpo (anticuerpos recombinantes o rAbs) específicos de proteínas virales se ha demostrado que puede inmunomodular o interferir con la infección viral (Tavladoraki y col, 1993). La eficacia de esta estrategia depende principalmente de la naturaleza del antígeno y/o epítipo reconocido por el fragmento de anticuerpo recombinante, de la correcta expresión y acumulación del anticuerpo recombinante y del compartimento celular al que vaya dirigido. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto sobre la infección viral de la expresión de anticuerpos recombinantes específicos de proteínas del virus de la sharka en plantas transgénicas de una especie modelo (*Nicotiana benthamiana*) como paso previo a su uso en *Prunus* cuando estos puedan ser transformados y regenerados con éxito.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron rAbs en formato cadena simple de regiones variables (scFv) específicos de la proteína de la capsida (scFv4C) y de la RNA replicasa (scFv2A) (Esteban et al., 2003) del virus de la sharka. Se construyeron diversas versiones para ser expresadas en diferentes compartimentos celulares mediante la adición de peptidos señal. En total se dispone de: dos versiones citosólicas del fragmento scFv4C, con y sin el tetrapéptido KDEL que estabiliza la acumulación en citosol y de tres versiones del fragmento scFv2A, una citosólica (scFv2A), una nuclear (NLS-scFv2A) y otra unida a la membrana del retículo endoplásmico (6K2-scFv2A). Se obtuvieron plantas transgénicas de *N. benthamiana* que expresaban constitutivamente: los fragmentos scFv4C (líneas 4C), scFv4CKDEL (líneas 4CK), scFv2A (líneas 2A), 6K2-scFv2A (líneas 2AK) y NLSscFv2A (líneas 2AN). Algunas de estas líneas transgénicas fueron seleccionadas para realizar experimentos de desafío con PPV. Los experimentos de desafío se realizaron mediante inoculación mecánica con el aislado 3.3 RB/Nb (PPV tipo D y no transmisible por pulgón) a diferentes dosis de inóculo. A la vez que las líneas transgénicas que expresaban las diferentes versiones de fragmentos scFvs específicos de PPV, como controles se inocularon también plantas no transformadas, plantas transformadas con un vector vacío (líneas Ø) y plantas que expresan un fragmento scFv específico del virus de la tristeza de los cítricos (Terrada et al., 2000) (líneas DF).

## RESULTADOS

### Transformación genética y expresión del transgén

Se analizó mediante PCR el carácter transgénico de las *N. benthamiana* transformadas con cada una de las construcciones, posteriormente mediante RT-PCR se confirmó que el transgén se transcribía correctamente en todas las líneas que fueron PCR positivas. Mediante análisis por inmunopresión-ELISA y western blot se confirmó la expresión funcional del transgén en algunas líneas (6K2A y K4C), pero no en otras (4C, 2A y 2AN) con expresión citosólica y nuclear, respectivamente. La detección negativa se debió probablemente a que el ambiente reductor del citosol y el núcleo limita la acumulación de la proteína a niveles muy bajos.

### Experimento de desafío

Para evaluar la resistencia de las diferentes líneas transgénicas obtenidas se realizaron experimentos de desafío por inoculación mecánica del virus (tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes de infección a los 30 días post inoculación en plantas control y plantas transgénicas que expresan diferentes versiones de scFv específicos de Nib replicasa y CP de PPV

	ScFvs específico de Nib replicasa				ScFvs específico CP		
		dosis alta % infección <sup>a</sup>	dosis moderada % infección <sup>a</sup>			dosis moderada % infección <sup>a</sup>	
	no transf.	96% (47/49)	79% (15/19)		líneas Ø	95% (19/20)	
	líneas Ø	98% (40/41)	83% (24/29)		líneas DF	91% (11/12)	
	líneas DF	97% (31/32)	76% (29/38)		control <sup>b</sup>	93%	
Líneas citosólicas	control <sup>b</sup>	97%	79%		4C.8.2	35% (29/34)	
	2A.3	85% (29/34)	40% (4/10)		4C.17.3	62% (34/34)	
	2A.4	100% (34/34)	77% (10/13)		4C.20.1	78% (24/24)	
	2A.5	100% (24/24)	42% (13/31)		4CK.6.1	21% (3/14)	
	2A.6	n.d.	n.d.	57% (12/21)	4CK.6.2	38% (5/13)	
Líneas RE	2A.7	n.d.	n.d.	66% (21/31)	KDEL	4CK.10.3	85% (11/13)
	2AK.1	74% (17/23)	48% (16/33)				
	2AK.2	100% (24/24)	54% (15/28)				
Líneas nucleares	2AK.3	100% (24/24)	82% (23/28)				
	2AN.7	100% (20/20)	92% (11/12)				
	2AN.10	96% (26/27)	85% (22/26)				
	2AN.11	88% (28/32)	16% (3/19)				
	2AN.12	100% (17/17)	82% (14/17)				

<sup>a</sup> entre paréntesis se indica el número de plantas infectadas respecto del número total de plantas inoculadas.

<sup>b</sup> porcentaje de infección promedio de las líneas usadas como control

El sombreado indica diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto del control

Se puede observar cómo los niveles de protección están directamente relacionados con la dosis de inóculo y que las líneas en las que se acumulan los fragmentos scFv en mayor cantidad también poseen porcentajes de infección menores. No obstante, hay que tener en cuenta que algunas líneas que expresan los fragmentos scFv en el citosol, donde se acumulan en cantidad muy baja o incluso indetectable, presentan porcentajes de infección significativamente diferentes de los controles, sobre todo a dosis de inóculo menores. Por ello, el citosol seguramente es el compartimento celular más adecuado para dirigir fragmentos scFv. Los resultados sugieren que en condiciones naturales la estrategia de los fragmentos scFv podría ser mucho más efectiva ya que el virus de la sharka se propaga de forma natural por pulgón y un pulgón inocula una dosis muy baja de virus.

Esteban, O., García, J.A., Gorris, M.T., Domínguez, E and Cambra, M. 2003. Generation of functional recombinant antibody fragments against RNA replicase Nib from plum pox virus. BBRC 301: 167-175.

Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., de Martinis, D., Cattaneo, A. and Galeffi, P. 1993. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. Nature: 366: 4469-472.

Terrada, E., Kerschbaumer, R.J., Giunta, G., Galeffi, P., Himmler, G. and Cambra, M. (2000). Fully "recombinant enzyme-linked immunosorbent assays" using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of Citrus tristeza virus. Phytopathology 90: 1337-1344.