

# Diseño y obtención de los vectores de expresión para la producción transitoria de la isoforma soluble del receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) en *Nicotiana benthamiana*

Marypaz Hernández-Sicaeros<sup>a</sup>, Isaías Balderas Rentería<sup>a</sup>, Karla Ramírez-Estrada<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Lab. de metabolismo celular, CELAES, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Av. Universidad s/n Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. México.

\*karla.ramirezst@uanl.edu.mx

**Palabras clave:** RAGE, proteína recombinante, expresión transitoria, *Nicotiana benthamiana*.

## Introducción

La población mundial ha pasado por un proceso de transformación metabólica debido a los cambios de estilo de vida; pasando de la actividad al sedentarismo. Estos factores junto con la alta prevalencia de obesidad y sobrepeso están aumentando la cantidad de pacientes con enfermedades crónicas como la Diabetes Mellitus (DM). La DM es una de las primeras causas de muerte y discapacidad en México<sup>1</sup>. La activación del receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) por la interacción con los ligandos AGEs consumidos a través de la dieta o producidos endógenamente, está relacionada directamente con la fisiopatología de las complicaciones de la DM. La isoforma soluble de RAGE (sRAGE) compite directamente con RAGE en la unión a los ligandos. Esto evita la cascada de señalización inflamatoria nociva, ya que sRAGE carece de la capacidad de transducción de señales al núcleo celular<sup>2</sup>. En este proyecto se busca la producción de sRAGE mediante expresión transitoria en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Este tipo de producción ofrece ventajas sobre otros sistemas de expresión al ser un organismo vegetal de rápido crecimiento.

## Metodología

Se diseñó un vector de entrada (pENTRY221-sRAGE) con optimización de uso de codones para *N. benthamiana* compatible con el sistema de clonación GATEWAY. Este contiene la secuencia correspondiente a la isoforma soluble del gen RAGE humano (NCBI ID: NM\_001206966.2). El vector de entrada fue diseñado para recombinar con los plásmidos binarios pEARLEYGATE-100, pEARLEYGATE-103 (Etiqueta c-terminal GFP-6xHIS) y pEARLEYGATE-205 (Etiqueta c-terminal TAP) mediante la reacción LR del sistema GATEWAY<sup>3</sup> y así generar los vectores de expresión compatibles con las plantas de *N. benthamiana*.

Los vectores de expresión resultantes serán clonados mediante electroporación en células de *Agrobacterium tumefaciens*. Este último será utilizado para realizar la transformación transitoria en plantas de *N. benthamiana* (4-6 semanas de edad) por medio de agroinfiltración<sup>4</sup>. Para ello, se establecieron las condiciones de desarrollo de las plantas.

Se evaluará el día con mayor expresión posterior a la agroinfiltración por medio de la técnica de Western blot. Posteriormente se comparará el efecto del vector de expresión utilizado en los niveles de expresión de la proteína recombinante.



**Figura 1.** Plantas de *N. benthamiana* de 5 semanas en la cámara de crecimiento.

Una vez finalizada la reacción de recombinación (LR), se transformó en células de *E. coli* DH5a. Obtuvimos colonias que fueron comprobadas por PCR para los vectores de expresión (Fig. 2).

## Conclusiones

Se diseñó un vector de entrada para el sistema GATEWAY con la secuencia optimizada al uso de codones de *N. benthamiana*. Se definieron las condiciones de crecimiento de la planta en el laboratorio. Se llevó a cabo la reacción de recombinación LR y se obtuvieron los vectores de expresión pEARLEYGATE100-sRAGE, pEARLEYGATE103-sRAGE y pEARLEYGATE205-sRAGE. Con éstos realizaremos la expresión transitoria de la proteína sRAGE en plantas de *N. benthamiana*.

## Agradecimientos

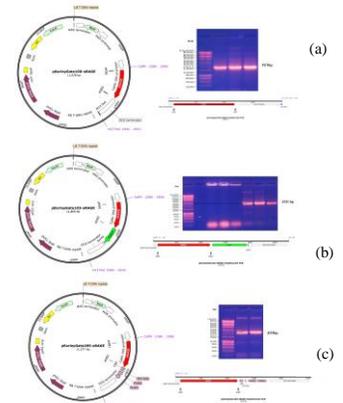
MHS a la FCQ y al CONACYT por la beca otorgada.

## Referencias

- Omar Y. Bello-Chavolla, Rosalba Rojas-Martinez, Carlos A. Aguilar-Salinas, Mauricio Hernández-Avila. Nutr Rev 2017, Vol 75 Pages 4-12.
- Fishman, S. L., Sonmez, H., Basman, C., Singh, V., & Poretsky, L. Mol Med. 2018, 24(1), 59-59.
- Reece-Hoyes, J.; Walhout, A. Cold Spring Harb Protoc 2018, 2018 (1),
- Ma, L., Lukasik, E., Gawehns, F. Methods Mol Biol 2011, vol 835

## Resultados y discusión

Las condiciones óptimas para el crecimiento de *N. benthamiana* fueron las siguientes; cámara de crecimiento con fotoperiodo de día largo (16h luz / 8h oscuridad) (Fig. 1). El sustrato óptimo fue; peat moss: vermiculita: perlita (2:1:1).



**Figura 2.** Mapas de los vectores de expresión y PCR de clonas positivas. En letras violetas se muestra el sitio de hibridación de los primers en los mapas y en seguida el gel de agarosa con el fragmento correspondiente. (a) pEARLEYGATE100-sRAGE: 1979pb (b) pEARLEYGATE103-sRAGE: 2741pb (c) pEARLEYGATE205-sRAGE: 2518pb