

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^a, Isaías Balderas Rentería^a, Karla Ramírez-Estrada^{a*}

^aLab. 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 México¹. 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 celular². 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 GATEWAY³ 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 agroinfiltración⁴. 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* DH5α. 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).

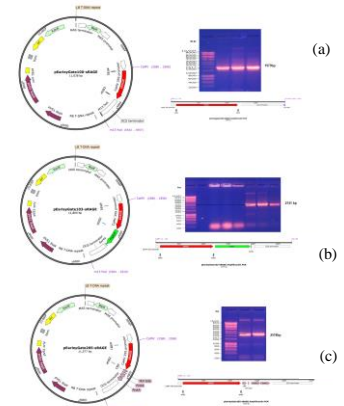


Figura 2. Mapas de los vectores de expresión y PCR de clonas positivas. En letras violetas se muestra el sitio de hibridación de los primers en los mapas y en seguida el gel de agarosa con el fragmento correspondiente. (a) pEARLEYGATE100-sRAGE: 1979pb (b) pEARLEYGATE103-sRAGE: 2741pb (c) pEARLEYGATE205-sRAGE: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