

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO EN PLANTAS TRANSGÉNICAS: EL CASO DE LA AEGYPTINA

Anai Delgado Varona^a, Nancy S. Hernández Bueno^b y Ramón Suárez Rodríguez^b

^aFacultad de Ciencias Biológicas; ^bLaboratorio de Fisiología Molecular de Plantas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001, Colonia Chamilpa. Cuernavaca, Morelos. Correo-e: anai_delgado95@hotmail.com y rsuarez@uaem.mx

INTRODUCCIÓN

Las plantas pueden ser utilizadas como fábricas de moléculas, ya que es posible expresar en estos organismos genes de cualquier origen, inclusive humanos. Los sistemas de producción de fármacos como proteínas recombinantes actualmente emplean bacterias, levaduras y células de mamíferos en cultivo, pero cada uno de estos sistemas presentan limitaciones. Las ventajas de las plantas superan a las de los sistemas mencionados, ya que incluyen los bajos costos, la producción a gran escala, etc. Una ventaja adicional es que las plantas permiten el almacenamiento estable de la proteína recombinante en semillas y tubérculos, facilitando su almacenamiento, transporte y distribución.

En el presente proyecto evaluaremos la factibilidad de expresar una proteína de la glándula salival del mosquito *Aedes aegypti* que es el principal vector del virus dengue. La fiebre del dengue es una enfermedad viral infecciosa de las más importantes del mundo (Kim *et al.*, 2010). Los artrópodos hematófagos han evolucionado una mezcla compleja de componentes salivales para contrarrestar la agregación de plaquetas, coagulación de la sangre, la vasoconstricción, y la inflamación para superar este eficiente y redundante sistema hemostático de los vertebrados (Ribeiro *et al.*, 2010). La proteína en estudio Aegyptina, es una proteína salival secretada por *A. aegypti*, se une al colágeno e inhibe la agregación y adhesión plaquetaria (Mizurini *et al.*, 2013).

El tabaco presenta diferentes vías para la transformación genética, siendo una de las más importantes la mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

A. tumefaciens y sus especies relacionadas como *A. rhizogenes* y *A. vitis* son patógenos reconocidos de plantas y tienen la capacidad de integrar establemente parte de su material genético dentro del genoma de su hospedero (Tzfira y Citovsky, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

I) Vector de transformación



Figura 1. Aspecto del T-DNA de la construcción de p2X35SAegyptina, el cual contiene: regiones reguladoras esenciales en el vector: (NOS) promotor de la nopalina sintasa; (NPTII) gen de resistencia al antibiótico kanamicina; (2X35S) promotor bifuncional 35S del virus del mosaico de la coliflor; la proteína de la glándula salival del mosquito *A. aegypti*; (RB) borde derecho y (LB) borde izquierdo.

II) Obtención de plantas transgénicas

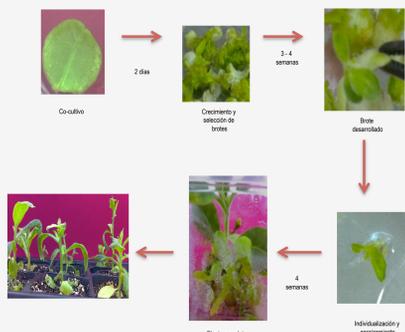


Figura 2. Sistema de transformación y regeneración en tabaco.

III) Análisis molecular



Figura 3. Extracción de DNA de plantas transgénicas de la F2 y PCR.

RESULTADOS

Crecimiento de plantas en condiciones estériles:

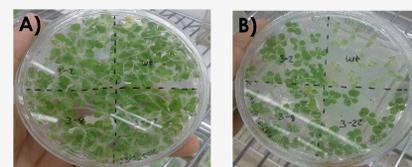
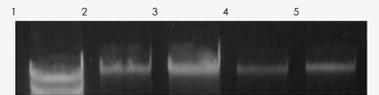


Figura 4. Aspecto de la germinación de semillas de tabaco silvestres (WT) y transgénicas (3-2, 3-8 y 3-22), en medio MS suplementado con kanamicina. A) medio MS normal y B) medio MS suplementado con kanamicina.

Extracción de DNA genómico de plantas de tabaco

Figura 5. Extracción de DNA genómico de plantas de tabaco. En el carril 1 se encuentra el marcador molecular, en el carril 2 la planta silvestre, línea transgénica 3-2, en el 3, línea transgénica 3-8 en el 4 y línea transgénica 3-22 en el carril 5.



Análisis molecular por PCR

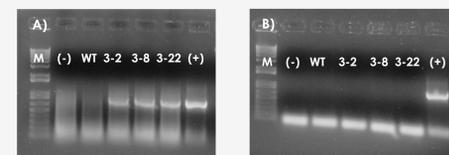


Figura 6. Productos de PCR de las muestras de tabaco: A) amplificación del gen de resistencia a kanamicina (*nptII*) y B) amplificación del gen de interés de la *aegyptina*. M= marcador de peso molecular; (-)= control negativo de amplificación sin DNA; WT= planta de tabaco silvestre; 3-2, 3-8 y 3-22= plantas transgénicas de tabaco y (+)= control positivo de amplificación usando como templado el plásmido p2Xaegyptina.

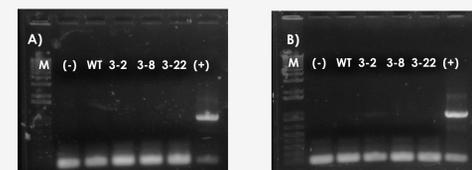


Figura 7. Productos de PCR de las muestras de tabaco: A) amplificación del gen de resistencia a kanamicina (*nptII*) y B) amplificación del gen de interés de la *aegyptina*. M= marcador de peso molecular; (-)= control negativo de amplificación sin DNA; WT= planta de tabaco silvestre; 3-2, 3-8 y 3-22= plantas transgénicas de tabaco y (+)= control positivo de amplificación usando como templado el plásmido p2Xaegyptina.

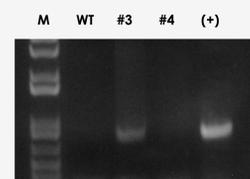


Figura 8. Productos de PCR de las muestras F1 de tabaco para el gen de la *aegyptina*. M= marcador de peso molecular; WT= planta de tabaco silvestre; #3 planta positiva a *aegyptina*; #4 planta negativa a *aegyptina*; y (+)= control positivo de amplificación usando como templado el plásmido p2Xaegyptina.

CONCLUSIONES

- Las plantas transgénicas de tabaco no segregan el gen de *aegyptina* en las filiales 2 y 3.

PERSPECTIVAS

- Investigar a fondo del rearrreglo del DNA de la *aegyptina* al introducirse al genoma de la planta.
- Determinar la presencia del gen de *aegyptina* en muestras de DNA de semilla F3.
- Evaluar la expresión de la *aegyptina* (RT-PCR y Western blot).

BIBLIOGRAFIA

- Gelvin, S (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(1):16-37.
- Kim GT, Kim MY, Yang MS (2010). Cholera toxin B subunit-domain III of dengue virus envelope glycoprotein E fusion protein production in transgenic plants. *Protein Expression and Purification* 74:236-241.
- Ribeiro JM, Mans BJ and Arcà B (2010). An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. *Insect Biochem Mol Biol.* 40 (11): 767-784.
- Tzfira T, Vaidya M and Citovsky V (2002). Increasing plant susceptibility to *Agrobacterium* infection by overexpression of the Arabidopsis nuclear protein VIP1. *PNAS* 99 (16):10435-10440.