

Localización intracelular de proteínas involucradas en el proceso patogénico de *Metarhizium anisopliae*

Antonio Carlos Daniel Torres García (1), Juan Carlos Torres Guzmán (2)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: dan.112@hotmail.com

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: torguz@ugto.mx

Resumen

Metarhizium anisopliae es un hongo entomopatógeno comúnmente aislado de suelos e insectos de todos los continentes, excepto la Antártida y es capaz de matar al menos siete órdenes de insectos. Su metabolismo le permite crecer en escases de nutrientes y en presencia de compuestos tóxicos para otros hongos. Sin embargo, el tiempo que tarda en matar al insecto plaga es prolongado, lo cual limita drásticamente sus aplicaciones. Por esta razón se han realizado diversos estudios con el propósito de encontrar posibles nuevos factores de virulencia que permitan aumentar su capacidad patogénica. Entre estos, en nuestro grupo se han aislado 6 genes que codifican proteínas con actividad de 2 nitropropano dioxigenasa. Con el fin de avanzar en el conocimiento de la función de estos genes. En este proyecto se planteó la localización intracelular de proteínas codificadas por estos genes 2np, mediante fusiones génicas con proteínas fluorescente, para ello se utilizaron transformantes de *S. cerevisiae* como receptores de las fusiones génicas 2np-mCherry. Mediante microscopia de fluorescencia se analizó su localización intracelular. Por último, se realizó el etiquetamiento del gen *PEX16* con el gen GFP mediante amplificación de los fragmentos mediante PCR y la posterior fusión de los mismos mediante PCR de fusión.

Abstract

Metarhizium anisopliae is an entomopathogenic fungus commonly isolated from soil and insects from all continents except Antarctica and is capable of killing at least seven orders of insects. Your metabolism allowed to grow shortage of nutrients and toxic compounds in the presence of other fungi. However, the time it takes to kill the insect pest is prolonged, which severely limits their applications. For this reason there have been various studies in order to find potential new virulence factors that increase their pathogenicity. Among these, in our group we have been isolated 6 genes encoding proteins with activity of 2 nitropropane dioxigenase. In order to advance the understanding of the function of these genes. In this project the intracellular localization of genes encoded by these 2np through gene fusions with fluorescent proteins, for it were used as transformants of *S. cerevisiae* gene fusions receptors 2np-mCherry raised. By fluorescence microscopy it was analyzed their intracellular localization. Finally, the labeling of *PEX16* gene was performed with the GFP gene by amplification of fragments by PCR and subsequent melting thereof by fusion PCR.

Palabras Clave

Metarhizium, Entomopatógeno, , nitropropano dioxigenasa, peroxisomas, mCherry

INTRODUCCIÓN

Generalidades de *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae es un hongo filamentosamente entomopatógeno, que causa la enfermedad conocida como muerte verde. Es comúnmente aislado de suelos e insectos de todos los continentes, excepto la Antártida y es capaz de matar al menos siete órdenes de insectos. Entre los que se encuentran *Plutella xylostella* y *Phytophaga ravidia*, así como *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* y *Periplaneta americana* [1].

M. anisopliae tiene la capacidad de formar varios tipos celulares (conidios, hifas, apresorio, blastoesporas) lo que facilita la infección del insecto blanco [1]. El proceso de infección de *M. anisopliae* comienza cuando los conidios se adhieren a la cutícula del insecto hospedero mediante interacciones hidrofóbicas y una capa de material mucilaginoso, si las condiciones son idóneas, el conidio germina formando el tubo germinativo, el cual se diferenciará en una estructura denominada apresorio [2]. Del apresorio emerge la hifa infectiva que penetrará la cutícula hasta llegar a la hemolinfa en donde podrá diferenciarse a blastoesporas, estructuras que proliferarán y consumirán los nutrientes existentes en la hemolinfa. Una vez que se agoten los nutrientes las blastoesporas se diferenciarán a micelio el cual emergerá nuevamente atravesando la cutícula del insecto formando nuevamente conidios infectivos [2]. La patogenicidad del hongo no está determinada por un solo factor, sino que es dependiente de la interacción coordinada de todos ellos [3]. A pesar que ya han sido reportados varios factores de patogenicidad, se ha descrito que existen otros genes que codifican potenciales factores implicados en su mecanismo de invasión.

Nitropropano Dioxigenasas

Dentro de estos posibles nuevos factores se encuentran los genes *2np*. Estos genes codifican para proteínas con actividad de 2-nitropropano

dioxigenasa. Estas enzimas catalizan la desnitrificación oxidativa de nitroalcanos a su correspondiente compuesto carbonilo y nitro. Se ha reportado que organismos como *Hippocrepsis comosa* genera nitroalcanos como mecanismos de defensa, y ya han sido caracterizadas bioquímicamente las enzimas 2-Nitropropano dioxigenasa de *Hansenula mrakii* y *Neurospora crassa*. Sin embargo, hasta el momento no ha sido reportada su función biológica. En el genoma de *Metarhizium* se ha reportado la secuencia de 6 posibles genes *2np* [4]. En nuestro grupo de trabajo se han realizado diversos estudios tendientes a demostrar su actividad bioquímica y su posible participación en el ciclo de vida del hongo. En la secuencia de aminoácidos de las 6 proteínas *2np* se encuentra la secuencia PTS1 que es una señal de localización peroxisomal, lo que sugiere que estas enzimas se encuentran compartimentalizadas en este organelo. Para demostrarlo en nuestro grupo de trabajo se ha realizado fusiones génicas de los genes *2np* con el gen de la proteína fluorescente mCherry. Por lo que en este trabajo se pretende demostrar su posible localización peroxisomal empleando como modelo cepas de *Saccharomyces cerevisiae* las cuales contienen los peroxisomas etiquetados con la proteína GFP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas: Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este proyecto se enlistan a continuación:

- **YJR01:** Transformante derivada de la cepa BY4741 de que expresa la fusión *2np3-mCherry* dentro del plásmido pYES 2.0 MATa; *his3Δ*; *leuΔ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ1*
- **YJR03:** Transformante derivada de la cepa BY47412GFPSKL que expresa la fusión *2np3-mCherry* dentro del plásmido pYES 2.0 MATa; *his3Δ1*; *leuΔ0*; *met15Δ0*; *ura3D1*
- **YJR05:** Transformante derivada de la cepa BY4742 PotGFP que expresa la fusión *2np3-mCherry* dentro del plásmido pYES 2.0 MATa; *his3Δ1*; *leuD0*; *lys2Δ0*; *ura3Δ0*

- **Sc2np4-mCherry-2:** Etiquetamiento del gen 2np4 con mCherry en el vector pYES2.0. Transformada en BY4741
- **ScGFPSKL-2np4-mCherry:** Etiquetamiento del gen 2np4 con mCherry en el vector pYES2.0. Transformada en BY4742 (GFP-SKL)
- **ScPotSKL-2np4-mCherry:** Etiquetamiento del gen 2np4 con mCherry en el vector pYES2.0. Transformada en BY4742 (POT-SKL)

Plásmidos: el plásmido utilizado en este trabajo fue el plásmido pGG225, el cual es un plásmido de 6443 pb que contiene el promotor fuerte de Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa (gpdA) de 2129 pb y el terminador de triptófano (trpC) de 666 pb del hongo *Aspergillus nidulans*. Entre el promotor y el terminador está el gen de la medusa *Aequorea victoria*, gfp de 714 pb flanqueado por los sitios de restricción NcoI y BamHI. Contiene el gen de la resistencia a ampicilina como marcador de selección en *E.coli*.

Oligonucleótidos: los oligonucleótidos usados en este trabajo se enlistan a continuación:

- **gpdA-PEX directo:** La secuencia es “GGTAACCAATTCCCTTGTATCTCTACA CAC”; Es un oligonucleótido directo diseñado a partir del promotor gpdA, conteniendo el sitio de restricción HpaI en el extremo 5'. Amplifica 2121 pb.
- **gpdA-PEX reverso:** La secuencia es “GCCCTTGCTCACCATGGGAAAAGAAA GAGA”; Es un oligonucleótido reverso diseñado a partir del promotor gpdA, conteniendo 15 pb del gen GFP. Amplifica 2121 pb.
- **GFP-PEX directo:** La secuencia es “GTAAGCGAAGGAGACATGGTGAGCAA GGGC”; Es un oligonucleótido directo diseñado a partir del ORF del gen GFP, contiene 15 pb del promotor gpdA y 15 pb del gen GFP. Amplifica 742 pb.
- **GFP-PEX reverso:** La secuencia “GGCGGGTGCAGGCATCTTGACAGCT”; Es un oligonucleótido reverso diseñado a

partir del ORF del gen gfp, contiene 15 pb del gen *PEX16*, contiene 15 pb del gen GFP. Amplifica 742 pb.

- **PEX directo:** La secuencia es “GACGAGCTGTACAAGATGCCTGCACC CGCC”; Es un oligonucleótido directo diseñado a partir del ORF del gen *PEX16*, contiene 15 pb del gen GFP y 15 pb de *PEX16*. Amplifica 2418 pb.
- **PEX reverso:** La secuencia es “GTTAACAACAATGGTATCCCATGCTTC CCG”; Es un oligonucleótido reverso diseñado a partir del ORF del gen *PEX16*, contiene 20 pb del gen *PEX16* y el sitio de restricción HbaI. Amplifica 2418 pb.

Análisis de las fusiones 2np3-mCherry y 2np4-mCherry en *S. cerevisiae*.

Para la localización intracelular de las proteínas Ma2np se empleará a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como receptora de los fusiones génicas 2np-mCherry. Para ello se transformaron células competentes de las cepas de *S. cerevisiae* que contienen en su genoma la etiqueta POT1-GFP y/o GFP-SKL, etiquetados los peroxisomas con la proteína GFP; con los plásmidos que llevan las fusiones génica 2np4-mChery y 2np3-mCherry. La transformación se realizó mediante el método del Acetato de Litio y los transformantes se recuperaron en un medio mínimo carente de Uracilo. Una vez seleccionadas las transformantes éstas se crecieron en medio mínimo con Rafinosa, por un período de 18 horas, pasadas las cuales la expresión de los genes se realizará en medio conteniendo galactosa, como fuente de carbono (la expresión de los genes está bajo el control del promotor GAL). Se tomaron muestras a los distintos tiempos post-inducción de 0 a 18 horas y las alícuotas fueron observadas al microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2 equipado con iluminación fluorescente), para la localización de la fluorescencia debida a GFP y mCherry, determinando si existe co-localización. Las células se observaron utilizando los filtros TRITC HYQ 530-550/565/690-650 y GFP HYQ (LP) 425-475/480/485LP y el programa SPOT Advanced software versión 4.6.

Etiquetamiento del gen *PEX16* con el gen *GFP*.

La fusión del gen *PEX16* con el gen *GFP* se realizó en etapas, en la primera etapa se amplificaron los 3 fragmentos.

Para la amplificación del promotor *gpdA* se empleó 1 μ l del vector pGG225, 0.5 μ l de los oligonucleótidos *gpdA* directo y *gpdA* reverso, 5 μ l de agua grado HPLC y 18 μ l de JumpStart Taq ReadyMix. Todo ello para obtener el producto deseado de 2121 pb que contiene el sitio de restricción *HpaI* en el extremo 5' y un fragmento del gen *gfp* en el extremo 3'. Las condiciones a las que se trabajó la PCR fueron: 5 minutos a 95°C, posteriormente se realizaron 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C y 2.5 minutos a 72°C. Finalmente se colocó a 72°C por 5 minutos.

Para obtener el producto de la amplificación de 742 pb del gen *gfp* se empleó 1 μ l del vector pGG225, 0.5 μ l de los oligonucleótidos *gpdA* directo y *gpdA* reverso, 5 μ l de agua grado HPLC y 18 μ l de JumpStart Taq ReadyMix. El producto de la amplificación posee un fragmento del promotor *gpdA* en el extremo 5' y un fragmento del gen *PEX16* en el extremo 3'. Las condiciones a las que se trabajó la PCR fueron: 5 minutos a 95°C, posteriormente se realizaron 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 54°C y 1 minuto a 72°C. Finalmente se colocó a 72°C por 5 minutos.

Para obtener el producto de amplificación de 2418 pb del gen *PEX16*, que contiene el fragmento del gen *gfp* en el extremo 5' y el sitio de restricción *HbaI* en el extremo 3', se empleó 1 μ l del vector pGG225, 0.5 μ l de los oligonucleótidos *gpdA* directo y *gpdA* reverso, 5 μ l de agua grado HPLC y 18 μ l de JumpStart Taq ReadyMix. Las condiciones a las que se trabajó la PCR fueron: 5 minutos a 95°C, posteriormente se realizaron 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1.5 minutos a 55°C y 3 minutos a 72°C. Finalmente se colocó a 72°C por 5 minutos.

Una vez obtenidos los tres amplicones, estos se purificaron y se almacenaron para su posterior fusión mediante la técnica de PCR de fusión

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de las fusiones *2np3*-mCherry y *2np4*-mCherry en *S. cerevisiae*.

Para determinar la posible localización de las proteínas *2np3* y *2np4*, se generaron transformantes independientes de las cepas BY4741, BY4742GFP-SKL y BY4742Pot1-GFP. Las transformantes fueron seleccionadas en medio YNB carente de Uracilo y se seleccionaron las que crecieron mejor. Tanto los transformantes como los parentales fueron crecidas en medio de inducción YNB adicionado con galactosa al 2% y se observaron al microscopio de fluorescencia. Siguiendo el protocolo mencionado anteriormente, las muestras con mejor fluorescencia fueron las cepas, YJRO4 Y YJRO3 de *S. cerevisiae*. En la Figura 1 se observan las tres cepas en campo claro, Fluorescencia utilizando el filtro TRITC HYQ 530-550/565/690-650 y Fluorescencia utilizando el filtro GFP HYQ (LP) 425-475/480/485LP.

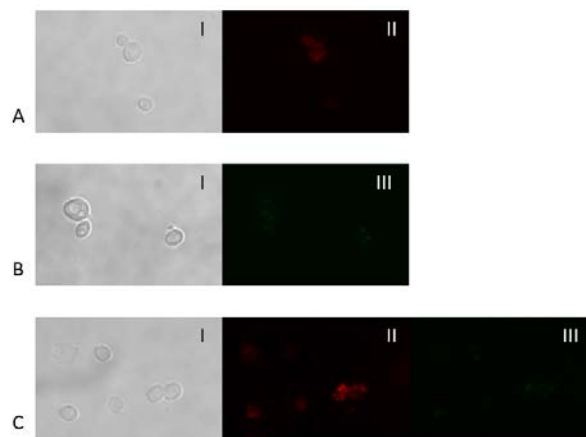


Figura 1: Localización intracelular de los productos de los genes *2np3* y *2np4* en las cepas, YJRO1, BY4742 GFP SKL y YJRO3 de *S. cerevisiae*. A) Células de la cepa YJRO1. B) Células de la cepa BY4742 GFP SKL. C) Células de la cepa YJRO3. I) Campo claro. II) Fluorescencia utilizando el filtro TRITC. III) Fluorescencia utilizando el filtro GFP.

Etiquetamiento del gen *PEX16* con el gen *GFP*.

Para la construcción del vector de *PEX16*-GFP se empleó la estrategia de PCR de fusión, para ello se amplificaron por separado los 3 fragmentos

correspondientes al promotor *gpdA*, el gen *GFP* y el gen *PEX16* como se muestra en la figura 2.

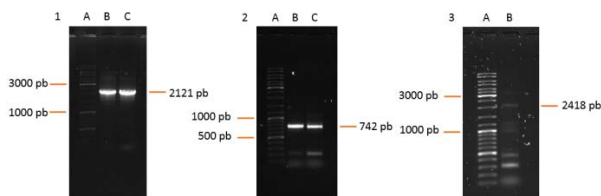


Figura 2: En la imagen se observan geles de agarosa al 1%. En el panel 1, los carriles B y C se muestran los productos de la amplificación de 2121 pb del promotor *gpdA*. En el panel 2, los carriles B y C muestran los productos de la amplificación de 742 pb de *GFP*. En el panel 3, el carril B muestra el producto de la amplificación de 2418 pb del gen *PEX16*. El carril A de los tres paneles muestra el marcador.

Como se observa en la figura 2, el producto de amplificación de *PEX16* se encuentra en baja concentración, por lo que aún se trabajará con las condiciones a emplear para lograr una mejor amplificación y así poder hacer la fusión de los fragmentos mediante la técnica de PCR de fusión.

CONCLUSIONES

Las proteínas producidas por los genes *2np3* y *2np4* de *M. anisopliae* tienen una localización peroxisomal cuando son expresadas en *S. cerevisiae*.

En el etiquetamiento del gen *PEX16* con el gen *GFP* se tuvieron complicaciones debido a la baja concentración de amplicón del gen *PEX16*, por lo que se trabajara en la estandarización de las condiciones y el protocolo para llevar a cabo la fusión y así construir el vector deseado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Juan Carlos Torres Guzmán y a la Dra. Gloria Angélica González Hernández por permitirme estar trabajando en el laboratorio, aconsejarme y brindarme parte del conocimiento que ellos tienen.

Este proyecto se realizó con los apoyos de los proyectos: Ciencia Básica SEP-CONACYT, convenio 220780; Convocatoria Institucional de Investigación Científica 2015, convenio 511/2015 y

641/2015, y Apoyo al Fortalecimiento de la Excelencia Académica 2014, convenio 005/2014.

REFERENCIAS

- [1] Fang W., Vega-Rodriguez J., Ghosh AK., Jacobes-Lorena M., Kang A., St Leger RJ. Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science*, 331:1074-1077.
- [2] Schrank A. y Vainstein MH (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56: 1267: 1274
- [3] Shah FA., Wang CS., Butt TM. (2005). Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS MICROBIOL Lett.* 251:259-266.
- [4] Cervantes Quintero, Karla Y.; González Hernández, Dra. Gloria Angélica; Torres Guzmán, Dr. Juan Carlos; Estudio de la función de la 2-nitropropano dioxigenasa I de *M. anisopliae*; 31 de agosto del 2013. Tesis de Maestría en ciencias (Biología).
- [5] Peter K. Kim y Robert T. Mullen; *PEX16*: Un regulador multifacético de la biogénesis de peroxisomas; *Frente Physiol.* 2013: 241. Publicado en internet el 2013 septiembre 3. Prepublicada línea 2013 agosto 2.