

ETIQUETAMIENTO DE UNA PROTEÍNA INTEGRAL DEL PEROXISOMA DE *METARHIZIUM*

Yadira Sarahi Guerrero Carrera (1), González Hernández Gloria Angélica (2), Torres Guzmán Juan Carlos (2), Victoria Esther Cerda de Loera (2)

1 [QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO, UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO] | [yadii_gro@hotmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [angelicagonzalez@live.com.mx]

Resumen

El género *Metarhizium* tiene diferentes estilos de vida, entre ellos es capaz de interactuar con insectos causándoles la muerte, también puede vivir como saprofito en el suelo y formar parte de la rizósfera de algunas plantas ayudándoles a crecer mejor. En este género no se ha descrito la presencia de peroxisomas, estructuras que en otros organismos son importantes en procesos de desintoxicación, los cuales podrían ser relevantes en la interacción del hongo con los insectos y/o con las plantas. Por lo que en el presente proyecto y mediante la aplicación de técnicas de biología molecular, se llevó a cabo el etiquetamiento del gen PEX12 con GFP. De esta manera la proteína híbrida PEX12-GFP, proteína integral de membrana del peroxisoma nos permitirá visualizar los peroxisomas en *Metarhizium* en ensayos *in vivo*.

Abstract

The genus *Metarhizium* has different lifestyles, among them is able to infect and kill insects. It can also live as a saprophyte in the soil and be part of the rhizosphere of some plants helping them to grow better. In this genre it has not been described the presence of peroxisomes, structures that in other organisms are important in detoxification process, which could be relevant when the fungus interacts with insects and/or plants. So in this project and through the application of molecular biology techniques, it was conducted the labeling of the gene PEX12 with GFP. Thus, the hybrid protein PEX12-GFP, integral of membrane of peroxisome will allow us to view these structures in *Metarhizium* during *in vivo* assays.

Palabras Clave

PEX12; señal peroxisomal PTS1; GFP

INTRODUCCIÓN

Generalidades

Los hongos entomopatógenos han jugado un papel muy importante en la historia del control biológico de plagas, ya que ellos no son contaminantes del ambiente sino que forman parte del equilibrio natural del ecosistema [1]. Este amplio grupo de microorganismos proveen múltiples servicios a los sistemas agro-ecológicos, por su manera de regular las plagas de insectos manteniéndolas en niveles adecuados que no produzcan daños a los cultivos de insectos. Adicionalmente este hongo puede ser rizósfera competente ayudando a las plantas a absorber mejor los nutrientes, favoreciendo su crecimiento. Y también puede llevar a cabo un estilo de vida saprófito.

En la interacción del hongo con insectos y con las plantas, puede enfrentarse a diferentes tipos de compuestos tóxicos producidos por estos eucariotas superiores como mecanismo de defensa. Por lo que se esperaría que el hongo despliegue actividades que le permitan desintoxicarse y poder llegar a un equilibrio. En la desintoxicación podrían estar involucrados los peroxisomas

Peroxisomas

Los peroxisomas (microcuerpos) son orgánulos esféricos pequeños (0.5 μm de diámetro) limitados por una membrana. Contiene enzimas oxidativas, en particular catalasa y otras peroxidases. Prácticamente todas las enzimas oxidativas generan peróxido de hidrógeno como producto de la reacción de oxidación. El peróxido de hidrógeno es una sustancia tóxica. La catalasa, que siempre está presente en los peroxisomas, regula con precisión el contenido celular de peróxido de hidrógeno y lo degrada para proteger a la célula de daño oxidativo. En los organismos en los que se han descrito los peroxisomas, las principales funciones son:

- Llevan a cabo reacciones oxidativas de degradación de ácidos grasos y aminoácidos, generando H_2O_2 . En las plantas y en los hongos la β -oxidación se

lleva a cabo exclusivamente en los peroxisomas [2].

- Intervienen en reacciones de desintoxicación.

Debido a que los peroxisomas no contienen DNA, todas las proteínas de la membrana del peroxisoma son codificadas en el núcleo, sintetizadas en ribosomas libres en el citoplasma y transportadas al interior del peroxisoma totalmente plegadas y aún en forma oligomérica. Existen al menos dos tipos de señal para dirigir a las proteínas al peroxisoma, las proteínas de membrana de clase I y II.

La mayoría de las proteínas de la matriz presentan un tipo de señal (PTS1) en el C-terminal que consiste de un tripéptido (ser/ala, lis/arg/his, leu), secuencia que es reconocida por el receptor soluble, Pex5 dirigiendo a la proteína hacia el complejo en el cual participa Pex12 transportando la proteína a la matriz peroxisomal (ver figura 1) [3].

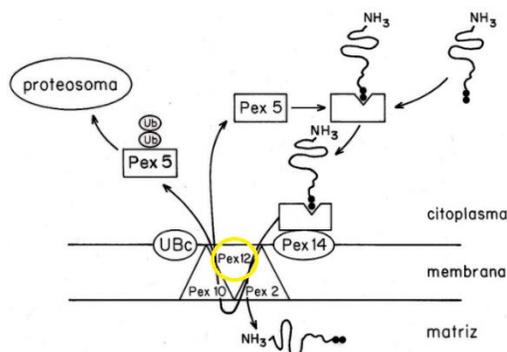


FIGURA 1. Importación de proteínas a la matriz del peroxisoma, Tomada y modificada de Salceda Sacanelles, Rocio, (2008). **PEROXISOMAS: ORGANELOS POLIFACETICOS.** Revista Educación Bioquímica, Vol. 27, pp. 83

GFP, proteína reportera

La proteína verde fluorescente (GFP) es producida por la medusa *Aequorea victoria*, y se caracteriza porque emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible, y es una proteína de ubicación citoplásmica. El gen que codifica para esta proteína ha sido aislado y ha sido ampliamente utilizado en muchos organismos, tal cual y/o fusionada a proteínas para visualizar y dar seguimiento a diversos procesos *in vivo*.

Por lo que nuestra hipótesis de trabajo es que al etiquetar a la proteína Pex12 de *Metarhizium* (proteína integral de la membrana peroxisoma) con GFP, generaremos la herramienta molecular que requerimos para en un futuro inmediato, etiquetar los peroxisomas y visualizarlos por microscopía de fluorescencia en el propio *Metarhizium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmidos empleados en este trabajo: pPAGICA113. Y los vectores construidos en este trabajo: pGG690 (pGEM-TEASY-PEX 12-GFP) y pGG691 (pPAGICA113-PEX12-GFP)

1. Microorganismos empleados: *E. coli* DH5 α
2. PCR de fusión PEX12-GFP

Mediante PCR se amplificaron los ORF de los genes PEX12 y GFP. Los oligos se diseñaron para generar secuencias de empalme entre el extremo 3' de PEX12 con el extremo 5' de GFP.

Se llevó a cabo la fusión de los amplicones PEX12 y GFP mediante PCR y finalmente su posterior amplificación.

Purificación de productos PCR: estos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, se cortó del gel la banda que contenía el DNA de interés, y mediante cromatografía de afinidad se purificó utilizando QIAquick® GEL EXTRACTION KIT siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante QUIAGEN.

Ligación en PGEMT-easy; el amplicón purificado se ligó al vector PGEMT-easy mezclando 4 μ l del amplicón, 1 μ l del vector, 1 μ l de T4 DNA ligasa y 5 μ l de tampón de ligación. Se incubó 1 h a temperatura ambiente, y enseguida a 4°C por 24 h.

Transformación de *E. coli* DH5 α por choque térmico [4] se emplearon 50 μ l de células competentes DH5 α y 4 μ l del producto de ligación. Se aplicó choque térmico, se permitió su recuperación en medio LB y al final de la transformación, se espatularon 300 μ l en placas de medio LB sólido, conteniendo ampicilina, las cuales se incubaron a 37 °C toda la noche.

Purificación del plásmido para su posterior secuenciación, mediante QIAprep® Spin Miniprep

kit. Las células de cultivos de 5ml fueron colectadas y procesadas siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Comprobando mediante cortes con enzimas de restricción la presencia de fragmento en el vector. Las restricciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante BIOLABS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fusión de los fragmentos PEX-GFP se realizó como se describe en materiales y métodos, obteniendo el amplicón esperado de 2011 pb, como se observa en la figura 2.

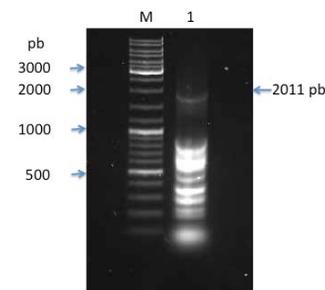


FIGURA 2. Fusión del fragmento PEX-GFP. M, marcadores de tamaño en pb. Carril 1, amplificación de la fusión PEX12-GFP de 2011pb.

Este amplicón se purificó y se ligó al vector de mantenimiento PGEM T-easy. Se introdujo a *E. coli* por transformación como se describe en materiales y métodos, recuperando las colonias blancas obtenidas (figura 3), las cuales pueden distinguirse perfectamente y corresponden a los recombinantes.

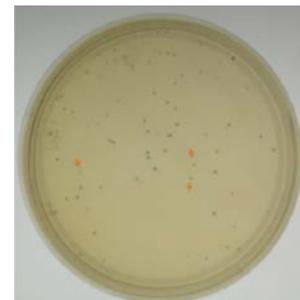


FIGURA 3. Transformantes de *E. coli* que llevan la fusión PEX-GFP en el vector PGEM- T easy. Las flechas señalan colonias blancas, posibles recombinantes.

El recombinante de pGEMTeasy-PEX12-GFP se comprobó mediante corte con EcoRI HF, como se

observa en la figura 4, obteniendo dos bandas, una de 2011pb correspondiente al fragmento de interés y la banda de 3015 pb correspondiente a PGEMT-easy. Este plásmido se nombró pGG690 y está en proceso de secuenciación para verificar la identidad y fusión de PEX12-GFP.

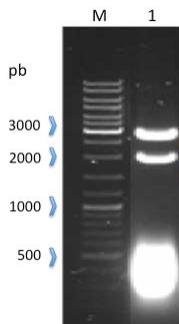


FIGURA 4. Comprobación por restricción del plásmido recombinante pPGEMT-easy-PEX12-GFP. M, marcadores de tamaño en pb. Carril 1, plásmido pGG690 cortado con la enzima EcoRI. La cabeza de flecha anaranjada señala la fusión PEX12-GFP.

Subclonación de PEX12-GFP en el vector binario pPAGICA113. La fusión PEX12-GFP se recuperó del plásmido pGG690 por restricción con las enzimas *Bgl*II y *Ssp*I y se ligó al vector binario pPAGICA113 linealizado previamente con las enzimas *Bam*HI y *Ssp*I. El plásmido recombinante se recuperó por transformación y amplificación en *E. coli* identificando el plásmido recombinante por amplificación de la fusión PEX12-GFP mediante PCR. Este plásmido se nombró pGG691. Con esta construcción podemos decir que contamos con la herramienta molecular para etiquetar *in vivo* los peroxisomas de *Metarhizium*.

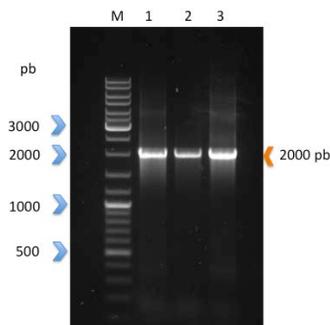


FIGURA 5. Comprobación de la subclonación de PEX12-GFP en pPAGICA113 mediante PCR. M, marcadores de tamaño en pb. Carriles 1, 2, y 3, amplicones de la fusión PEX12-GFP en los

clones 1, 2 y 5. La cabeza de flecha anaranjada señala el amplicón PEX12-GFP.

CONCLUSIONES

En este trabajo se logró la fusión en fase de PEX12-GFP y se encuentra en el vector binario pPAGICA113 bajo control de un promotor fuerte constitutivo como lo demuestran los resultados obtenidos mediante PCR. La ligación en el vector binario permitirá en un futuro inmediato emplearse para la *Agro*transformación de *Metarhizium* y visualizar en este organismo los peroxisomas.

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres y hermanos; que siempre han estado apoyándome, y me han sabido escuchar en todo momento y dar palabras de aliento.

A la Dra. Gloria Angélica González Hernández y al Dr. del Dr. Juan Carlos Torres Guzmán por haberme brindado la oportunidad de trabajar y colaborar en su proyecto, en su laboratorio y haber aprendido no solo de excelentes Doctores, si no de fantásticas personas.

A mi amiga Q.F.B. Victoria Esther Cerda de Loera por todo el apoyo brindado a lo largo del verano, para la realización del proyecto. Gracias por brindarme la oportunidad de enriquecerme con tus conocimientos y aprender de una gran persona.

Al equipo de trabajo del laboratorio GENMOL por los consejos, las enseñanzas y el excelente ambiente de trabajo.

Gracias al Verano de la Investigación Científica edición 2016, por la beca otorgada

Este proyecto se realizó gracias al financiamiento a los proyectos por parte de: Ciencia Básica SEP-CONACYT, convenio 220780; Apoyo al Fortalecimiento de la Excelencia Académica 2014 y 2015, modalidad Infraestructura 005 y 003.

REFERENCIAS

[1] Lujan, M. (s.f.). Importancia del hongo *Metarhizium anisopliae* como insecticida microbiológico en el control de plaga nocivas. 4a

Habana, Cuba. Centro de Formación y Documentación Agropecuaria.
46 p.

[2] H. Ross Michael, Wojciech Pawlina, (2007), Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular, (5ta ed), Madrid España, editorial medica panamericana. S.A.

[3] Salceda Sacanelles, Rocio, (2008). PEROXISOMAS: ORGANELOS POLIFACETICOS. Revista Educación Bioquímica, Vol. 27, pp. 85-92.

[4] Sambrook, Joseph, Russell David W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press