

Análisis de la expresión del gen 2np4 del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en *E. coli*

Yadira Sarahi Guerrero Carrera (1), Gloria Angélica González Hernández (2)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, 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 del hongo entomopatógeno *Metarhizium* tiene un papel importante en el control biológico de plagas agrícolas y de vectores de enfermedades humanas. En 2011 se liberó el genoma de este hongo, encontrando 4 genes adicionales relacionados con los genes 2np1 y 2np2 quienes codifican para 2-nitropropano dioxigenasa, los cuales se denominaron 2np3, 2np4, 2np5 y 2np6. En el presente proyecto y mediante la aplicación de técnicas de biología molecular, se logró la expresión del gen 2np4 en *E. coli* BL21 (pLys). Y se identificó la proteína 2Np4 por su inducibilidad y coincidencia con el peso molecular predicho de 38 kDa.

Abstract

The fungus *Metarhizium* spp has an important role for the biological control of agricultural pests and for control of vectors of human diseases. In 2011, the genome release of *M. anisopliae* facilitated the finding of 4 new genes related to 2np1 and 2np2 genes which code for 2-nitropropane dioxygenase proteins. These genes were named 2np3, 2np4, 2np5 and 2np6. In this work using techniques of molecular biology, the 2np4 gene was overexpressed in *E. coli* BL21 (pLys), and its protein was identified because of its molecular weight of 37 kDa, similar to the predicted weight according the 2Np4 sequence.

Palabras Clave | Palabra clave 1; 2-nitropropano dioxigenasa. Palabra clave 2; expresión heteróloga.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

Los hongos entomopatógenos han jugado un papel muy importante en la historia del control biológico o microbiológico de plagas, ya que ellos no son contaminantes del ambiente sino que forman parte del equilibrio natural del ecosistema [1]. Este amplio grupo de microorganismo 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. Por la eficiencia en el control de plagas y vectores, pueden producirse bioinsecticidas a partir de diferentes géneros y especies de hongos entomopatógenos cuyo ingrediente activo es el propio hongo [2].

Género *Metarhizium*

Los hongos del género *Metarhizium* son entomopatógenos verdaderos anamorfos y facultativos. Fue aislado por primera vez en 1879 del escarabajo *Anisoplia austriaca* por Metchnikoff, quien sugiere su uso por primera vez como agente microbiano para el control de insectos [3].

Metarhizium anisopliae es un hongo entomopatógeno cuya reproducción asexual se realiza a partir de conidios producidos por hifas que se forman de hifas ramificadas. Presenta una coloración verde olivo sobre el cadáver del insecto por lo que el nombre común para la enfermedad producida por este, es “muerte verde” [4].

El proceso de invasión de *M. anisopliae* a sus hospederos, comienza cuando los conidios germinan, producen una estructura de adhesión denominada apresorio y las hifas penetran la cutícula de los insectos, se ramifican los micelios en el hemocele del insecto, produciendo toxinas y utilizando los nutrientes solubles. Posteriormente, los micelios emergen y producen conidios verdes en la superficie del cadáver, lo que resulta en la momificación del insectos, es lo que se conoce comúnmente como enfermedad de la muscardina verde [5].

- 2-Nitropropano Dioxigenasa

Se ha observado que *M. anisopliae* posee en su genoma 6 genes tipo 2-np (nitropropano dioxigenasa) denominados 2np1, 2np2, 2np3, 2np4, 2np5 y 2np6. De varios de estos sabemos que codifican para proteínas con actividad de nitropropano dioxigenasa.

El presente trabajo se enfocó en el gen 2np4, en el cual se plantea determinar la actividad bioquímica de la proteína codificada por el gen y comprobar que forma parte de la familia de 2-nitropropano dioxigenasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmidos utilizados en este trabajo: pGG674 (pRSETA 2np4, construido por Adriana García Tapia) y pGG468 (pRSETA2np1, construido por [6] y utilizado como control positivo. Plasmido pRSETA, vector de expresión de genes en *E. coli* (invitrogen).

Microorganismos empleados: *E. coli* BL21 (pLys) y DH5alfa.

Las células *E. coli* BL21 químicamente competentes de las cepas se prepararon siguiendo el protocolo descrito por el proveedor (invitrogen).

Transformación *E. coli* BL21 por choque térmico: Mediante la técnica descrita en [7], se emplearon 50 μ l de células competentes BL21 y 1 μ l de plásmido pGG674, pGG468 y pRSET-A. Se les 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 y cloranfenicol, las cuales se incubaron a 37 °C toda la noche.

Inducción de la expresión de 2np1 y 2np4: Cinco colonias aisladas se sembraron en medio LB (líquido) con ampicilina-cloranfenicol, incubando toda la noche a 37°C en agitación. Posteriormente se sembraron alícuotas de este precultivo en medio LB ampicilina-cloranfenicol hasta alcanzar una D.O a 600 nm de 0.1 y se incubó hasta una D.O de 0.4- 0.6. Enseguida se adicionó IPTG a una concentración final de 1mM recuperando alícuotas a las cero, tres y cuatro horas postinducción. Las células se recuperaron por centrifugación y posteriormente la pastilla fue

resuspendida en amortiguador de fosfato (20mM, pH 7.5) y se rompieron las células por sonicación durante 15 segundos.

SDS PAGE: Se prepararon geles de poliacrilamida al 12%. Se cargó en el primer pocillo marcadores de peso molecular en kDa y en los siguientes carriles se cargaron 15 ug de proteína de las muestras sonicadas. Las muestras en el gel se sometieron a electroforesis a 30 Amperios durante 2.5 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Células químicamente competentes y transformación.

La realización de las células químicamente competentes se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos. Estas células recién preparadas se utilizaron para introducirles por transformación por choque térmico los plásmidos pGG674, pGG468 previamente construidos, los cuales portan los cDNA de los genes 2np4 y 2np1 subclonados en pRSETA, respectivamente. Se utilizó el plásmido pGG468 el cual porta el gen 2np1 como control positivo de expresión. Adicionalmente se transformó *E. coli* con pRSETA para usarlo como control negativo. Los transformantes se seleccionaron en medio LB sólido conteniendo ampicilina y cloranfenicol obteniéndose colonias aisladas las necesarias, tanto de las transformantes con los plásmidos control, como de las transformantes que llevan el plásmido de interés, como puede verse en la Figura 1.

Expresión del 2np4 en E. coli

Se analizó la expresión de los genes 2np4 y 2np1 en varias de las colonias de cada tipo de transformante en respuesta al IPTG el cual permite remover el represor del operador para que se lleve a cabo la transcripción y se promueva la síntesis de la proteína de interés. Para ello se tomaron alícuotas a las 0h y 3 h, se lisaron las células por sonicación y las proteínas se separaron por SDS-PAGE como se indica en Materiales y Métodos.

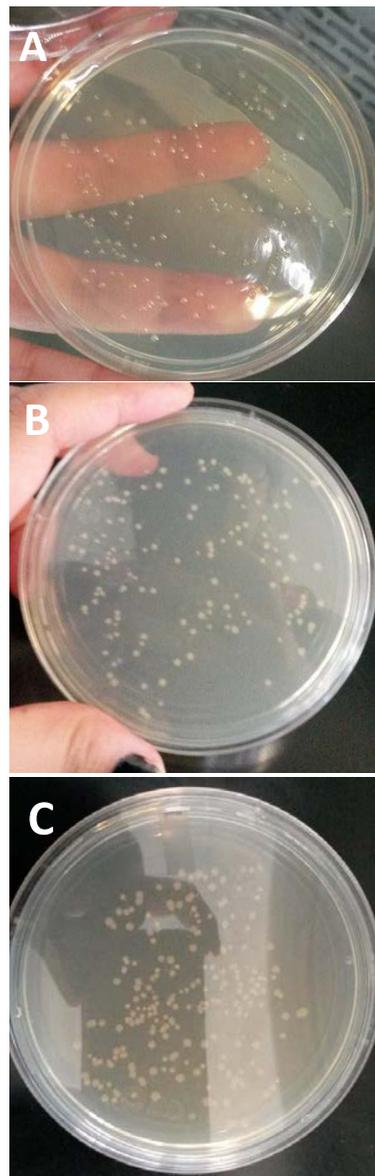


Figura1. Transformantes BL21 (pLYS). A. Transformantes obtenidas con: el plásmido pGG674 (2np4). B. Transformantes obtenidas con el plásmido pGG468 (2np1). C. Transformantes obtenidas con el plásmido pRSETA-A.

Posteriormente las proteínas presentes en los geles se revelaron por tinción con azul de Coomassie. En la Figura 2 se observó que en todas las muestras correspondientes a la inducción con IPTG (I) la presencia de una banda de proteína de 38 kDa (Fig. 2A) y de 45 kDa (Fig. 2B) correspondiente a lo esperado según los pesos moleculares predichos de las proteínas 2Np4p y 2Np1p, respectivamente. Cabe hacer notar que dichas bandas prácticamente no se observan en los carriles correspondientes a células sin inducir con IPTG (NI). También en la misma Figura 2 se observa que las muestras denominadas como (I), presentan bandas más intensas y más anchas en cuanto a su grosor comparadas con los controles sin inducir (NI) respectivos, indicando la presencia de mayor cantidad de las proteínas de interés en estas clonas. Cabe señalar que este experimento se realizó dos veces de manera independiente observándose en ambos casos la inducción de las proteínas respectivas solo en presencia de IPTG. También es importante mencionar que los clones que llevan el plásmido control positivo pGG468 se comportaron según lo descrito por [6].

CONCLUSIONES

En este trabajo se logró la expresión heteróloga del gen 2np4 del hongo entomopatógeno *Metarhizium* en *E. coli* BL21 como lo demuestran los resultados obtenidos de la electroforesis SDS-PAGE posterior a la inducción con IPTG. La proteína observada se encuentra soluble y tiene un peso molecular similar al esperado según la secuencia predicha de la proteína 2Np4 de 38 kDa. La solubilidad de la proteína facilitará la caracterización en un futuro inmediato, de la actividad de esta posible Nitropropano dioxigenasa.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo de los proyectos: Ciencia Básica SEP-CONACYT, convenios 220780 y 388394; Convocatoria Institucional de Investigación Científica, convenios 415/2014, 511/2015 y 641/2015; y Apoyo al

Fortalecimiento de la Excelencia Académica, modalidad Infraestructura convenio 005/2014.

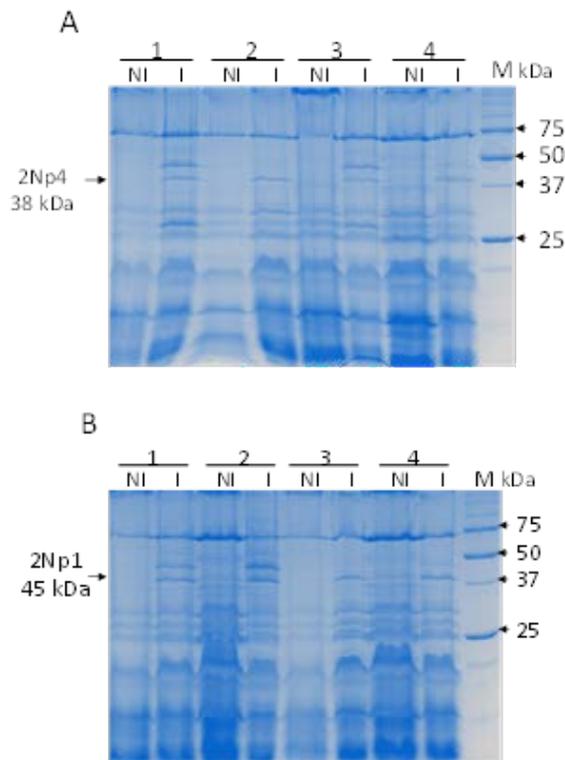


Figura2. Inducción de la expresión heteróloga de 2np4 Y 2np1. A. Clones 1, 2, 3 y 4 los cuales llevan el plásmido pGG674 (2np4). B. Clones 1, 2, 3 y 4 los cuales llevan el plásmido pGG468 (2np1). Se realizó electroforesis SDS-PAGE de los lisados de cada clon previamente inducido (I) o no inducido (NI) con IPTG 1mM durante 3 h. M, marcadores de peso molecular en kDa.

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. Juan Carlos Torres Guzmán por haberme brindado la oportunidad de trabajar y colaborar en su proyecto, en su laboratorio.

A la Q.B.F. Adriana García Tapia por todo el apoyo brindado a lo largo del verano, para la realización del proyecto. Gracias por brindarme la oportunidad de enriquecerme con sus conocimientos y aprender de una gran persona.

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

A veranos UG, por brindarme la oportunidad de ser partícipe de este proyecto y la beca otorgada.

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] Bragga, S., Screen, S. E. and St. Leger, R.J. 2004. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*.324: 159-169

[3] Ojeda C. M., R. R Vivas, E G. Velasco, R. L. Gutierrez y C. C. Vazquez . 2001 .Control of *Rhipicephalus mmicroplus* (Acari: Ixodidae) using the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Revista Mexicana de ciencias Pecuarias*. 2 (2):177-192.

[4] Small C. N. y M. J. Bidochka. 2005. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *The British Mycological Society*. 109 (3): 307-313.

[5] Small C. N. y M. J. Bidochka. 2005. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* . *The British Mycological Society*. 109 (3):307-313

[6] Padilla I. E. 2010. Estudio de la participación de genes expresados de manera diferencial durante el proceso de patogénico de *Metarhizium anisopliae*. Tesis de Doctorado. Universidad de Guanajuato.