

Construcción de plásmidos para la localización intracelular de proteínas involucradas en el proceso patogénico de *Metarhizium anisopliae*

Oliver Alejandro López Rodríguez (1), Claudia Erika Morales Hernández (2), Juan Carlos Torres Guzmán (3)

¹ Bachillerato General. Escuela de Nivel Medio Superior | Dirección de correo electrónico: dcheroes6@gmail.com

² Escuela de Nivel Medio Superior | Dirección de correo electrónico: c.moraleshernandez@ugto.mx

³ Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: torguz@ugto.mx

Resumen

Una de las estrategias para conocer la función biológica de las proteínas es identificar su localización intracelular. En este sentido las proteínas fluorescentes han sido una excelente herramienta molecular. *Metarhizium anisopliae* es un hongo entomopatógeno capaz de matar al menos siete órdenes de insectos. Su metabolismo le permite crecer en escasos 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, propone la localización intracelular de proteínas codificadas por estos genes *2np*, mediante fusiones génicas con proteínas fluorescente. En este proyecto se analizó la expresión en *E. coli* de plásmidos que portan distintas proteínas fluorescentes, con el propósito de identificar aquellas que sean más adecuadas para su utilización en el etiquetamiento de los genes *2np*.

Abstract

One of the main strategies in order to know the biological function of proteins is try to find their intracellular localization. In this sense the fluorescent proteins are one of the most successful molecular tools. *Metarhizium anisopliae* is an entomopathogenic fungus commonly isolated from soil and insects from all continents, except the Antarctica, and is capable of killing at least seven orders of insects. *Metarhizium* is capable to grow in a shortage of nutrients and toxic compounds produced by other fungi. However, the time it takes to kill the insect pest is prolonged, which severely limits its 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 dioxygenase. In order to advance the understanding of the function of these genes, we are interested in the intracellular localization of proteins encoded by these *2np* genes, using chimeric fusions with genes producing fluorescent proteins. In this project using *E. coli* as a host we analyzed plasmids carrying different fluorescent proteins in order to identify those that are most suitable to labeling the *2np* genes.

INTRODUCCIÓN

Metarhizium

Metarhizium anisopliae es un hongo filamentoso 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].

La patogenicidad del hongo no está determinada por un solo factor, sino que es dependiente de la interacción coordinada de todos ellos [2]. 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 los posibles nuevos factores de patogenicidad 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 se 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*. 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 de señal peroxisomal lo que sugiere que estas enzimas se

encuentran compartimentalizadas en este organelo. Para demostrarlo una de las estrategias a emplear es la construcción de quimeras génicas con genes que codifican para proteínas fluorescentes ellos [3]. En nuestro grupo de trabajo se han construido distintos plásmidos que portan versiones diferentes de proteínas fluorescentes por lo que en este proyecto se analizará la expresión de estas proteínas en la bacteria *E. coli* para valorar su posible utilización en el etiquetamiento de los genes *2np* de *Metarhizium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Transformación de *E. coli* con plásmidos que portan genes que codifican proteínas fluorescentes.

Se emplearon plásmidos que portan distintas proteínas fluorescente: el plásmido control pRSETA (Invitrogen), el plásmido TFP2 (que porta el gen que codifica la proteína roja fluorescente), plásmido mRFP (que porta el gen que codifica la proteína roja fluorescente modificada), Orange (que porta el gen de la proteína fluorescente orange), GFP (que porta el gen que codifica para la proteína verde fluorescente), CFP (que porta el gen que codifica para la proteína fluorescente cian), mCherry (que porta el gen que codifica para la proteína fluorescente Cherry modificada), Strawberry (que porta el gen que codifica para la proteína fluorescente strawberry), Tomato (que porta el gen que codifica para la proteína fluorescente tomato). Con estos plásmidos se transformaron células competentes de la bacteria *E. coli* DH5 α empleando el método de choque térmico. Se recuperaron las transformante en placas de medio LB con ampicilina. Posteriormente colonias de *E. coli* portando cada plásmido en particular se recuperaron y se incubaron en cajas Petri conteniendo medio LB con ampicilina, durante toda la noche a 37°C. Para verificar si existe expresión de la proteína fluorescente las cajas se visualizaron en un

transiluminador de luz azul (Safelimage, Invitrogen).

Inducción de la expresión de las proteínas fluorescentes

La inducción de los genes de las proteínas fluorescentes se realizó empleando IPTG a una concentración de 0.5 mM de acuerdo al protocolo descrito en el manual de procedimientos (pRSETA, Invitrogen). Brevemente, las células de *E. coli* que contienen los plásmidos se crecieron en medio LB con ampicilina durante toda la noche a 37°C, con agitación constante, posteriormente las células se recuperaron, se lavaron y resuspendieron en medio LB con ampicilina y con una concentración final de IPTG de 0.5mM durante 3 horas; se recuperaron las células por centrifugación y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

Los paquetes celulares obtenidos se rompieron mediante sonicación y los extractos crudos fueron almacenados a -20°C hasta su procesamiento.

Separación de las proteínas mediante electroforesis

La separación de las proteínas se realizó en condiciones desnaturizantes mediante geles de poliacrilamida al 12% de acuerdo al protocolo estándar [4]. Los geles fueron visualizados en un transiluminador con fuente de luz azul y posteriormente teñidos con azul de Coomasie por 30 minutos y desteñidos durante toda la noche.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el propósito de averiguar la mejor opción para etiquetar los genes *2np* de *M. anisopliae* mediante la construcción de quimeras génicas con genes que codifican para diversas variantes de proteínas fluorescentes previamente en el Laboratorio de Genética Molecular de Hongos se construyeron plásmidos que portan las siguientes variantes de proteínas fluorescentes: GFP, CFP, RFP, mCherry, Orange y Tomato. Todos los plásmidos

fueron construidos sirviendo como base el plásmido de expresión pRSETA, en este plásmido la expresión de los genes fluorescentes se realiza mediante la inducción con IPTG ya que se encuentran bajo el control del promotor GAL1. Con cada plásmido se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* DH5 α , se recuperaron las transformantes resistentes a ampicilina y las colonias obtenidas se sembraron nuevamente en cajas de Petri conteniendo medio LB con ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Las colonias obtenidas se observaron en un transiluminador de luz azul para observar las distintas variaciones de fluorescencia si la expresión fue exitosa.

Como se puede observar en las Figuras 1, 2 y 3, existe la expresión de los genes que codifican las distintas proteínas fluorescentes, ya que los colonias de *E. coli* muestran las distintas tonalidades, verde, naranja, ligeramente azul y rojo, característico de cada proteínas.

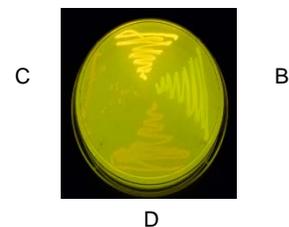


Figura 1. Placas de Petri conteniendo células de *E. coli* que portan los plásmidos de las proteínas A) Orange, B) Tomato , C) mCherry y D) mRFP.

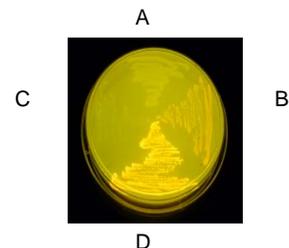


Figura 2. Placas de Petri conteniendo células de *E. coli* que portan los plásmidos de las proteínas A) CFP, B) Strawberry, C) GFP y D) TFP 2

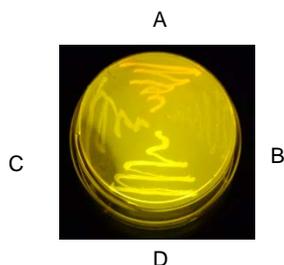


Figura 3. Placas de Petri conteniendo células de *E. coli* que portan los plásmidos de las proteínas A) Strawberry, B) GFP, C) Orange y D) Orange.

Para corroborar la expresión de cada proteína fluorescente, células de *E. coli* conteniendo cada plásmido se crecieron en medio LB durante toda la noche y se realizó la inducción de los genes con IPTG durante 3 horas, se colectaron las células y se obtuvieron los extractos celulares. Una alícuota de los extractos se separaron mediante geles de poli-acrilamida en condiciones desnaturizantes. Los geles se colocaron en un transiluminador de luz azul. Como se puede observar en las figuras 4 y 5, se pueden identificar plenamente las proteínas que corresponden a GFP y mCherry, las otras proteínas no es muy claro su inducción.

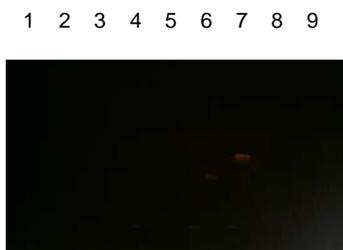


Figura 4. Geles de poli-acrilamida en condiciones desnaturizantes, visualizados en luz azul. Carril 1 Marcador de peso molecular, Carril 2 Control mRFP, Carril 3 mRFP inducido con IPTG, Carril 4 Control mCherry, Carril 5 mCherry inducido con IPTG, Carril 6 Control Orange, Carril 7 Orange inducido con IPTG, Carril 8 Control Tomato y Carril 9 Tomato inducido con IPTG.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Figura 5. Geles de poli-acrilamida en condiciones desnaturizantes, visualizados en luz azul. Carril 1 Marcador de peso molecular, Carril 2 Control GFP, Carril 3 GFP inducido con IPTG, Carril 4 Control CFP, Carril 5 CFP inducido con IPTG, Carril 6 Control Strawberry, Carril 7 Strawberry inducido con IPTG, Carril 8 Control TFP 2 y Carril 9 TFP 2 inducido con IPTG.

Para corroborar la expresión estos geles se tiñeron con azul de Coomasie. Como se puede observar en las figuras 7 y 8, en todos los casos existe la inducción las de proteínas correspondientes

1 2 3 4 5 6 7 8 9

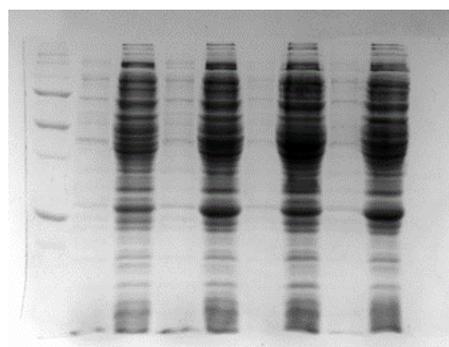


Figura 6. Geles de poli-acrilamida en condiciones desnaturizantes, visualizados en luz azul. Carril 1 Marcador de peso molecular, Carril 2 Control mRFP, Carril 3 mRFP inducido con IPTG, Carril 4 Control mCherry, Carril 5 mCherry inducido con IPTG, Carril 6 Control Orange, Carril 7 Orange inducido con IPTG, Carril 8 Control Tomato y Carril 9 Tomato inducido con IPTG.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

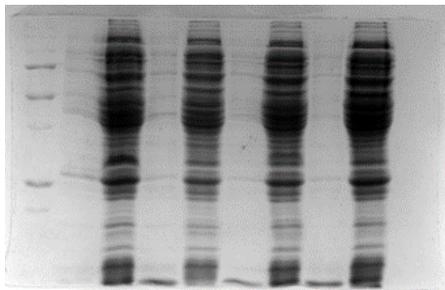


Figura 7. Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, visualizados en luz azul. . Carril 1 Marcador de peso molecular, Carril 2 Control GFP, Carril 3 GFP inducido con IPTG, Carril 4 Control CFP, Carril 5 CFP inducido con IPTG, Carril 6 Control Strawberry, Carril 7 Strawberry inducido con IPTG, Carril 8 Control TFP 2 y Carril 9 TFP 2 inducido con IPTG.

CONCLUSIONES

Se logró la inducción de la expresión de los genes que codifican a las proteínas fluorescentes: GFP, CFP, mCherry, RFP, Orange y Tomato en células de *E. coli*. Las proteínas que se pueden identificar tanto en células como en geles de electroforesis de proteínas son GFP y mCherry, por lo que se sugiere el empleo de estas proteínas para la construcción de las quimeras génicas.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al equipo, que aportó gran parte de su tiempo al desarrollo de cada uno de los procesos mencionados durante la metodología, ya que aportaron de su conocimiento para la utilización de distintas herramientas en el laboratorio y además de su experimentación también de manera que los resultados experimentales fueran satisfactorios.

El presente proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) proyectos: 388394 and 220780. Universidad de Guanajuato proyectos: 415/2014, 641/2015,

511/2015 y Apoyo Institucional para fortalecer la excelencia académica 2014, convenio 005/2014

REFERENCIAS

- [1] Fang W., Vega-Rodríguez 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] Dimitri M. Chuvacov, Mikail V. Matz, Sergey Lukinaov, *Fluorescent Proteins and their applications*, Physiological Reviews Published 1 July 2010, Vol. 90 no. 3, 1103-1163.
- [4]. Sambrook J. and Russell D.W. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd edition (January 15, 2001)