

ANÁLISIS COMPARATIVO DEL DNA GENÓMICO Y mRNA'S DE LOS GENES

GPA DE *Mucor circinelloides*

Ayala Lugo A.; Martínez Cadena Ma. G.; Sánchez Patlán A.A.

División de Ciencias Naturales y Exactas

Universidad de Guanajuato

RESUMEN

Durante este trabajo se realizó la amplificación de los genes, identificación de intrones y comparación de los tamaños entre el DNA genómico y mRNA's de una proteína G α de *Mucor circinelloides*. Se logró amplificar el mRNA y el DNA genómico del gen *gpa0*, encontrando que el tamaño de banda del mRNA fue menor que la observada cuando el DNA genómico se utilizó como templado. Estos resultados nos indican la presencia de intrones en este gen.

INTRODUCCIÓN

Todas las células tienen la capacidad de responder apropiada o mesuradamente a cambios en el medio ambiente y a otros estímulos externos. Las señales del medio extracelular son captadas por receptores en la superficie de la membrana plasmática y transmitidas a través de transductores hacia los amplificadores. Uno de estos transductores, los cuales regulan la apertura o cierre de cascadas de señalización son conocidos como proteínas G o proteínas nucleótidos de guanina (Hamm, 1998). Estas proteínas reguladoras de la transducción de señales están dividida en dos tipos, proteínas G Heterotriméricas y proteínas G monoméricas.

PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS

Las proteínas G transmiten una señal cuando están unidas al GTP pero esta señal cesa cuando éste es hidrolizado a GDP mediante una actividad intrínseca de GTPasa (Zhang, y col., 2004). Estas proteínas se encuentran acopladas a receptores serpentina, denominados así por que contienen 7 dominios de aminoácidos hidrofóbicos que atraviesan membrana citoplasmática. (Cabrera-Vera y col., 2003). En la Fig. 1 podemos observar el modelo propuesto para su activación e inactivación.

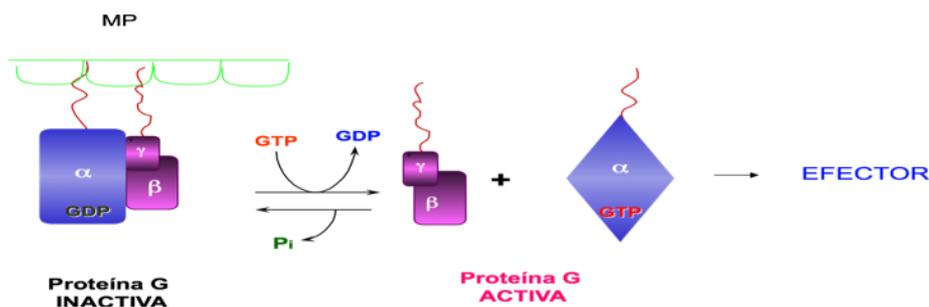


Fig. 1. Modelo de activación e inactivación de las proteínas G heterotriméricas.

Recientemente, en el laboratorio se ha reportado la presencia de GTPasas heterotriméricas y monoméricas en todos los estados de crecimiento de *Mucor circinelloides* (De la Cruz y col., 2007). Además, se han encontrado 4 proteínas G α en *Mucor* de las cuales, se cuenta con las secuencias completas de las proteínas Gpa1 y Gpa3 mientras que las secuencias de Gpa2 y Gpa 4 aún están incompletas. (Meza-Carmen y col., 2006). Por otra parte, Meza-Carmen encontró que el gen de *gpa3* de *M. circinelloides* incluye dos intrones, cuya posición con otros intrones de genes G α de diferentes hongos es la misma respecto al primer intrón de *gpa3*

en más de un 80% de las secuencias analizadas; mientras que la posición del segundo intrón de *gpa3* está menos conservada en los diferentes genes $G\alpha$. (Meza- Carmen y col., 2006).

JUSTIFICACIÓN

M. circinelloides es un hongo que se caracteriza por su propiedad dimórfica, esto es, puede presentar crecimiento micelial o levaduriforme dependiendo de las condiciones ambientales del cultivo, es por dicha propiedad que ha servido como modelo de estudio en el proceso de diferenciación celular. Estudios en el laboratorio demuestran que *gpa3* se expresa diferencialmente en el dimorfismo de *Mucor*. Es por esto que hemos planteado un enfoque molecular del estudio de la expresión de los otros genes de las *gpa*'s para avanzar en el conocimiento en las rutas de transducción de señales implicadas en la diferenciación de *Mucor*.

OBJETIVO

- Analizar y comparar las muestras de DNA genómico y mRNA de los genes *gpa*'s de *Mucor circinelloides*.

METODOLOGÍA

CULTIVO DE *Mucor circinelloides*

El cultivo de este hongo se realizó en medio YPG (extracto de levadura 0.3%, peptona de gelatina 0,1%, glucosa al 2 %, pH 4.5) en el cual se inocularon 5×10^5 esporas por mL en un matraz erlenmeyer de 2 L, y el cultivo se mantuvo en agitación constante durante 12 horas a 28 °C para posteriormente obtener el micelio.

EXTRACCIÓN DE RNA

El micelio obtenido se homogenizó en un mortero, utilizando N_2 líquido para mantener a una temperatura debajo de 0°C para no desnaturalizar al RNA. Se tomaron 100 mg, se les adicionó 1 ml de Trizol y se incubó por 5 min. Posteriormente se les adicionó 0.2 ml de cloroformo y se centrifugó a 12,000 g x 15 min, se tomó la fase acuosa y ésta se pasó a otro tubo y se le adicionó 0.5 ml de isopropanol para precipitar el RNA; la muestra se incubó a 15 - 30°C por 10 min y se centrifugó a no más de 12,000 g x 10 min. Después de este paso se formó una pastilla, se removió el sobrenadante y el precipitado se lavó con alcohol 75%, adicionando 1 ml del alcohol por cada ml de Trizol utilizado. La muestra se centrifugó a no más de 7,500 g x 5 minutos, y el sobrenadante se eliminó. La pastilla se resuspendió en agua libre de RNAsa.

REACCIÓN DE PCR CON GRADIENTE DE TEMPERATURA

Se realizaron reacciones a diferentes gradientes de las temperaturas de amplificación de los dependiendo éstas de las T_m de los oligos previamente diseñados, e igualmente las reacciones fueron realizadas a diferentes concentraciones de $MgCl_2$ ya que los genes de las diferentes *Gpa*'s amplificaban con diferentes condiciones.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Las muestras de RNA, DNA genómico, mRNA y cDNA fueron colocadas en geles de Agarosa al 1% y después de someter estos a electroforesis a 100 V, estas las bandas se observaron bajo luz UV en un transiluminador y de igual manera se tomaron fotografías para demostrar la presencia de las muestras previamente mencionadas.

RESULTADOS

En la Fig. 2 podemos observar que tanto el DNA genómico (Panel A) como el RNA (Panel B) obtenidos de micelio de 12 h de *Mucor circinelloides* fueron de muy calidad ya que no se observan degradación de ninguno de los ácidos nucleicos y se muestran ambas bandas al correr la muestra en

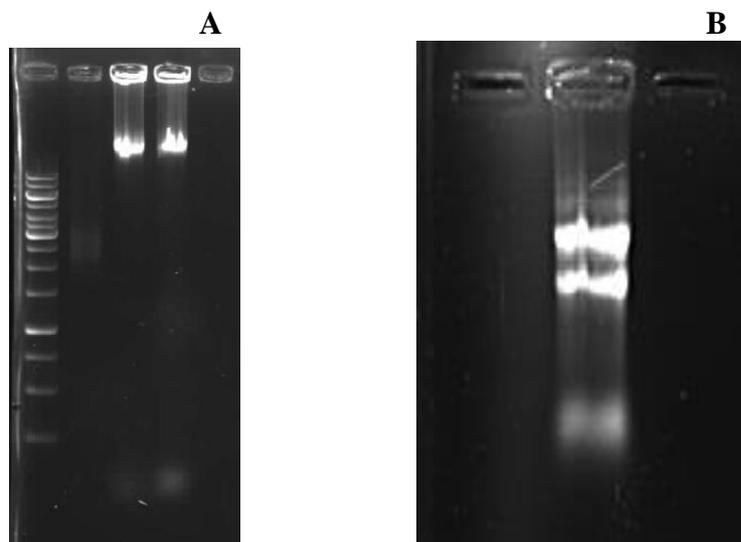


Figura 2. Electroforesis en gel es de agarosa al 1%. El DNA genómico (A) y el RNA total se sometieron a electroforesis en geles de azarosa al 1 %.

Posteriormente se amplificaron los fragmentos correspondientes a los genes *gpa0*, *gpa1* y *gpa4* a partir de DNA genómico. En la Fig. 3 podemos observar que todos los fragmentos se amplificaron con una tamaño esperado. Para el fragmento *gpa0* se esperaba un fragmento de 1008 pb (Fig. 3, carriles 2 y 3) para *gpa1* de 1014 pb (carriles 4 y 5) y para *gpa4* de 1073 (carriles 6 y 7).

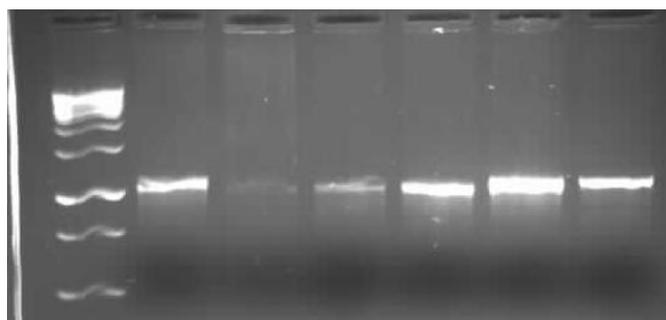


Fig. 3. Electroforesis en geles de agarosa al 1 % de los fragmentos de *gpa0*, *gpa1* y *gpa4* a partir del DNA genómico y utilizando una concentración de 3 mM MgCl₂. Carril 1, Marcadores de tamaño de DNA; carriles 2 y 3, *gpa0*; carriles 4 y 5, *gpa1* y carriles 6 y 7, *gpa4*.

Después se amplificó el fragmento *gpa2* utilizando diferentes temperaturas de alineamiento. En la Fig. 4 se muestra que a 3 de estas temperaturas de alineamiento se obtuvo una banda

esperada de 651 pb, correspondiente al fragmento del mensajero del gen *gpa2* con los oligonucleótidos utilizados.

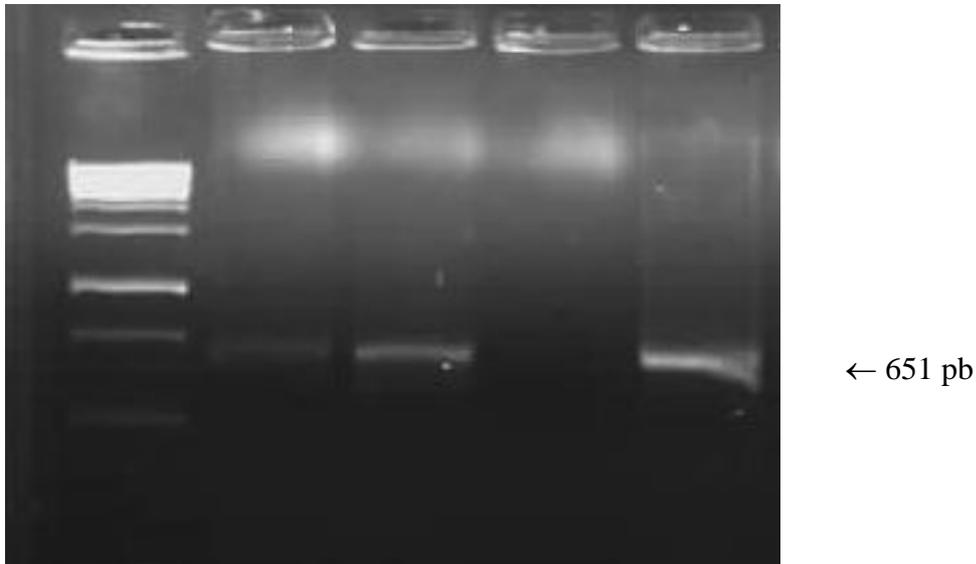


Fig. 4. Electroforesis en geles de agarosa al 1 % del fragmento *gpa2* obtenido a partir de la amplificación del DNA genómico a diferentes temperaturas y los oligonucleótidos específicos para este gen.

Para comprobar la calidad de cDNA obtenido a partir del RNA de cultivos de 12 h se amplificó un fragmento del gen constitutivo *tef*, el cual codifica para el factor de alargamiento de proteínas. En la Fig. 4 se puede observar una con el tamaño esperado del fragmento del mRNA del gen *tef*.

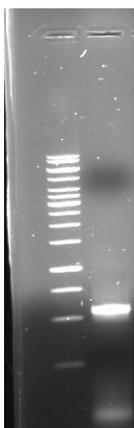


Fig. 4. Electroforesis en geles de agarosa al 1 % de la amplificación de un fragmento del gen *tef* a partir del cDNA. Carril 1, marcadores de tamaño del DNA y carril 2, *tef*.

Después de haber comprobado la calidad del cDNA, se hizo una mezcla del mismo con los y se amplificaron las diferentes Gpa's utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de estos. En la Fig. 5. Se puede observar que sólo se amplificó la banda correspondiente al mensajero del gen *gpa0* dando el tamaño de banda cuyo tamaño fue menor que la de aquella obtenida con el DNA indicando que este gen tiene intrones.

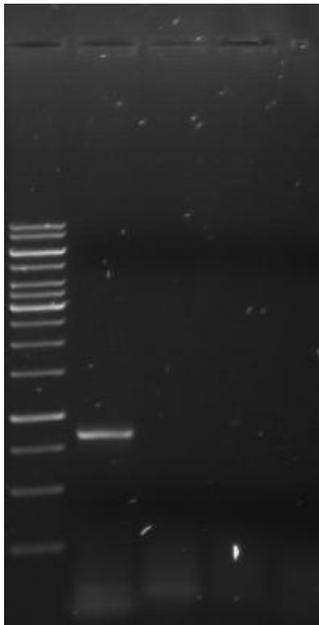


Fig. 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la amplificación de los fragmentos de mRNA de los genes *gpa0* (carril 2), *gpa1* (carril1), *gpa2* (carril 3) y *gpa4* (carril 4).

CONCLUSIÓN

Al haber analizado las muestras, a diferentes gradientes de temperatura y a diferentes concentraciones de $MgCl_2$, sólo se pudo reportar la presencia del mensajero de *gpa0* en mRNA de micelio de 12 h de *Mucor circinelloides*. En esta misma etapa de crecimiento del hongo, se deberían detectar otra Gpa, ya que la presencia de otra proteína Gpa se ha detectado en este tiempo de crecimiento, pero por falta de tiempo para realizar más estudios, no se pudo reportar un resultado con ambas Gpa's. Sin embargo el resultado obtenido, es de gran ayuda, ya que la secuencia de Gpa0 no está completamente reportada, si esta se purifica y se manda secuenciar, podríamos llegar a tener más resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aimi, T., Kano, S., Wang, Q. y Morinaga, T. (2001). Molecular cloning of three genes encoding G protein alpha subunit in the white root fungus, *Rosellinia necatrix*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65:678-682.
2. Bartnicki-García, S. y Lippman, E. (1969). Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. Science. 165: 302-304.
3. Bohm, A., Gaudet, R. y Sigler, P. B. (1997). Structural aspects of heterotrimeric G-protein signaling. Curr. Opin. Biotechnol. 8:480–487.
4. Cismowski, M. J., Takesono, A. Ma C., Lizano, J. S., Xie, X., Fuernkranz, H., Lanier, S. M. y Duzic, E. (1999). Genetic screens in yeast to identify mammalian non receptor modulators of G-protein signaling. Nat. Biotechnol. 17:878–883.