



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL
DEL BASIDIOMICETE *Ceriporiopsis subvermispota* EN RESPUESTA A
DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MANGANESO MEDIANTE LA TÉCNICA
cDNA-AFLP

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

LUIS GUSTAVO ALEJANDRO ROJAS SOTO

Director de Memoria

Dr. Sergio Lobos Camus
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante

Dr. Sergio Lobos Camus
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Chile

2006

*“The slogan 'press on' has solved and always
will solve the problems of the human race.”*

Calvin Coolidge

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que por diversas razones me han ayudado en el desarrollo de esta tesis.

- Al profesor Hugo Toncio el cual me motivó a entrar al mundo de la ciencia.
- Al doctor Sergio Lobos y a la doctora Daniela Seelenfreund que me permitieron participar del trabajo en su laboratorio, además de presentarme diversos desafíos que me han ayudado a formarme como científico.
- A todos los que han participado en el laboratorio de Bioquímica, los que hicieron de ese lugar muy especial. Quisiera agradecer especialmente a Roger, Erick, Rodrigo, Constanza, Ares, Emilio, Carolina, Matías por su gran ayuda y amistad.
- A todo el grupo del Box 1 en la Universidad Católica, los que fueron un importante apoyo durante mis estadías en el laboratorio de Bioquímica de esa universidad, especialmente a Alexis, Loreto, María Paz, Paola, Alejandro, Paulo, José y Karla.
- A la gente de la Fundación Ciencia Para La Vida, los cuales han sido muy importantes en la etapa de escritura de esta tesis, especialmente a Paula y Esteban por sus consejos y amistad.
- A mis compañeros de la carrera de Bioquímica, gracias por las diversas jornadas de estudio y esparcimiento.
- A mis amigos del colegio, especialmente a Álvaro, Amir, Carina, Claudia, Daniella, Enrique, Gonzalo, Karen, Sebastián y Shakti por su preocupación y amistad a lo largo de todos estos años.
- Especialmente quisiera agradecer a mi familia por el permanente apoyo, por siempre abrirme las puertas en vez de cerrarlas, y porque sin ustedes nunca hubiese sido lo que soy.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Sergio Lobos Camus. Financiada por el proyecto FONDECYT N° 1030495, titulado “Búsqueda de proteínas que regulan la expresión del sistema ligninolítico del basidiomicete *Ceriporiopsis subvermispora* en respuesta a metales y compuestos aromáticos”, y por el proyecto del Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada (MIFAB) P04-0071-F, titulado “Genetics of ligninolytic enzymes of fungi”.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iii
FINANCIAMIENTO	iv
INDICE GENERAL	v
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
SUMMARY	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El manganeso y su homeostasis	1
1.2. <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> y la degradación de lignina	4
1.3. Genómica	7
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1. Materiales	11
2.1.1. Cepa fúngica	11
2.1.3. Medios de cultivo	11
2.1.3.1. Medio de cultivo estacionario para <i>C. subvermispora</i>	11
2.1.3.2. Medio de cultivo estándar para <i>C. subvermispora</i>	12
2.1.3.3. Medio de cultivo para bacterias	12
2.1.4. Plasmidios	13
2.1.5. Enzimas	13
2.1.6. Oligonucleótidos	13
2.1.7. Sistemas comerciales	15
2.1.7.1. Purificación de ADN de la mezcla de PCR	15
2.1.7.2. Extracción de ADN plasmidial de <i>E. coli</i>	15
2.1.7.3. Purificación de ARNm poli(A)	15
2.1.8. Reactivos radioactivos	15
2.1.9. Reactivos generales	15
2.1.10. Material fotográfico	16
2.2. Métodos	16
2.2.1. Condiciones de cultivo	16
2.2.1.1. Crecimiento de <i>C. subvermispora</i> en medio estacionario	16
2.2.1.2. Crecimiento de <i>C. subvermispora</i> en medio estándar	17
2.2.2. Montaje de la técnica de cDNA-AFLP para <i>C. subvermispora</i>	17
2.2.2.1. Extracción de ARN a partir de micelio congelado	17
2.2.2.2. Purificación de ARNs poli(A)	18
2.2.2.3. Síntesis de ADNc de doble hebra	19

2.2.2.4.	Digestión con enzimas de restricción	19
2.2.2.5.	Preparación y ligación de adaptadores	19
2.2.2.6.	Pre-Amplificación mediante PCR	20
2.2.2.7.	Marcación radioactiva de partidores para amplificación selectiva	21
2.2.2.8.	Amplificación selectiva mediante PCR	21
2.2.2.9.	Visualización de cDNA-AFLP	21
2.2.3.	Identificación de TDFs visualizados mediante cDNA-AFLP	22
2.2.3.1.	Aislamiento y reamplificación de TDFs	22
2.2.3.2.	Purificación de fragmentos amplificados por PCR	22
2.2.3.3.	Ligación de amplificados de PCR al vector pCR2.1-TOPO TA	22
2.2.3.4.	Preparación de células electrocompetentes y transformación de <i>E. coli</i> mediante electroporación	23
2.2.3.5.	Extracción de ADN plasmidial para secuenciación	23
2.2.3.6.	Análisis bioinformático de secuencias obtenidas.	23
2.2.3.7.	Geles desnaturantes para ARN y Northern blot.	24
3.	RESULTADOS.....	26
3.1.	Cultivos y preparación del material biológico	26
3.2.	Montaje de la técnica de cDNA-AFLP	27
3.3.	Análisis mediante cDNA-AFLP	31
3.4.	Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas	35
3.5.	Validación de datos obtenidos por cDNA-AFLP mediante Northern blot	40
4.	DISCUSIÓN	42
4.1.	Análisis de la expresión génica de <i>C. subvermispora</i> mediante la técnica de cDNA-AFLP.	42
4.2.	Análisis de secuencias obtenidas a partir de cDNA-AFLP.	44
4.3.	Relación entre fragmentos identificados y manganeso.	44
4.4.	Corroboración de datos de cDNA-AFLP por Northern Blot.	49
5.	CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	51
6.	REFERENCIAS.....	53

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Oligonucleótidos utilizados	14
Tabla N°2. Partidores utilizados para el estudio de cDNA-AFLP	31
Tabla N°3. Nomenclatura de los fragmentos obtenidos mediante cDNA-AFLP.....	34
Tabla N°4. Homología y probable función de los TDFs identificados.....	36
Tabla N°5. Homología, localización y dominios transmembrana de los TDFs identificados	39

INDICE DE FIGURAS

Figura N°1. Esquema de la estructura de los adaptadores utilizados para cDNA-AFLP.	20
Figura N°2. Visualización de ARN total obtenido.....	27
Figura N°3. Esquema de la técnica de cDNA-AFLP	28
Figura N°4. Visualización de productos de PCR obtenidos tras la etapa de preamplificación.....	29
Figura N°5. Elección de parejas de partidores a utilizar para el análisis por cDNA-AFLP	30
Figura N°6. Análisis de patrones de expresión mediante la técnica de cDNA-AFLP	33
Figura N°7. Visualización de diversos fragmentos reamplificados obtenidos de geles de cDNA-AFLP	35
Figura N°8. Modelos obtenidos para los fragmentos Cs2AC2 y Cs2AF1	40
Figura N°9. Northern blot para la sonda Cs2AF2	41
Figura N°10. Modelos de proteínas transportadoras de la familia de ATPasa tipo P	45

ABREVIATURAS

[α - ³² P]-dCTP:	Desoxicitocina trifosfato marcada radiactivamente en el fosfato α con ³² P.
[γ - ³² P]-ATP:	Adenosina trifosfato marcada radiactivamente en el fosfato γ con ³² P.
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
ADNc	ADN complementario
A-NN	Partidor para cDNA-AFLP, con dos nucleótidos variables en el 3'
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA-AFLP	<i>cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
CFMR	<i>Center for Forest Mycology Research</i>
DDRT-PCR	<i>Differential Display Reverse Transcription-PCR</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
IPTG	Isopropilgalactósido
LB	Luria-Bertani
mCi	milicurie
<i>mnp</i>	Gen de manganeso peroxidasa
MnP	Manganeso peroxidasa
MnSOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MRE	<i>Metal Responsive Elements</i>
MRS	<i>Mur-Responsive Sequence</i>
Mur	<i>Manganese Uptake Regulator</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
oligo-dT	Oligómero de desoxitimina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
RT	<i>Reverse Transcription</i> , Transcripción inversa
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
TAA	Ácido trans-aconítico
TDF	<i>Transcript Derived Fragment</i> , fragmento derivado de transcrito
TMHMM	<i>Trans-Membrane Hidden Markov Motifs</i>
T-NN	Partidor para cDNA-AFLP, con dos nucleótidos variables en el 3'
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue identificar genes expresados diferencialmente en un organismo cuyo genoma no ha sido secuenciado. Investigamos los patrones globales de expresión en respuesta a cambios en la concentración de Mn^{2+} en el medio de cultivo, con el fin de identificar genes involucrados en el metabolismo y homeostasis de este catión.

El organismo modelo usado fue *Ceriporiopsis subvermispora*, un hongo ligninolítico altamente selectivo, el cual posee una maquinaria enzimática compuesta por peroxididasas dependientes de manganeso y lacasas principalmente. Para lograr el objetivo propuesto desarrollamos un protocolo de cDNA-AFLP (cDNA- *Amplified Fragment Length Polymorphism*) basado en la amplificación de fragmentos derivados de transcritos, para analizar los patrones de expresión génica en cultivos con diferente concentración de Mn^{2+} .

Al analizar los patrones generados obtenidos del hongo creciendo en diferentes concentraciones de manganeso, identificamos 34 fragmentos derivados de transcritos diferencialmente expresados en respuesta a manganeso. Veintidós de ellos mostraron homología con genes de función conocida o putativa, mientras que catorce de ellos no mostraron coincidencias considerables. El resultado más interesante fue identificar dos fragmentos derivados de transcritos que correspondían a la familia de transportadores tipo ABC (*ATP Binding Cassette*) altamente relacionados con la homeostasis de Mn^{2+} y Ca^{2+} .

SUMMARY

IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN THE BASIDIOMYCETE *Ceriporiopsis subvermispora* IN RESPONSE TO DIFFERENT MANGANESE CONCENTRATIONS BY cDNA-AFLP.

The aim of this work was to identify differentially expressed genes in an organism whose genome has not been sequenced. We investigated the global gene expression pattern regulated by manganese, in order to identify genes involved in its metabolism and homeostasis.

The model organism used was *Ceriporiopsis subvermispora*, a highly selective ligninolytic fungus, which possesses an enzymatic machinery composed of manganese-dependent peroxidases and laccase. In order to achieve this objective we developed a cDNA-AFLP (cDNA- *Amplified Fragment Length Polymorphism*) protocol based on the amplification of transcript derived fragments (TDFs) to analyze the gene expression patterns on different Mn²⁺ concentration cultures.

When analyzing cDNA-AFLP generated patterns obtained from the fungus grown on different concentrations of manganese, we identified 34 manganese-differentially expressed transcript derived fragments. Twenty of them showed significant homology to genes with known or putative function, while fourteen fragments did not show significant matches. Interestingly we identified two TDFs that correspond to members of the ABC (*ATP Binding Cassette*) transporter family closely related with Mn²⁺/Ca²⁺ homeostasis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El manganeso y su homeostasis

El manganeso es requerido como nutriente esencial, en su estado de oxidación (II), para el crecimiento y sobrevivencia en la mayoría, si no en todos los organismos. Diversas son las enzimas que requieren de este metal como cofactor para ejercer sus funciones, tales como oxidasas y deshidrogenasas, ADN y ARN polimerasas, quinasas, descarboxilasas, y transferasas de grupos azúcares (Cullota y cols., 2005). Se podría decir que las enzimas que requieren este metal como cofactor existen en cada organelo de la célula eucariótica. Para que el manganeso alcance dichos blancos de acción este ión debe sobrellevar un gran número de obstáculos, atravesando las bicapas lipídicas de membranas tanto de la superficie celular como también de los organelos en células eucarióticas. Si bien la importancia del manganeso para la vida ha sido reconocida desde hace largo tiempo, el conocimiento de los mecanismos de transporte y regulación de su homeostasis en la célula son poco comprendidos en la mayoría de los organismos y sólo recientemente se han hecho avances en el conocimiento de este proceso en algunos organismos como *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y algunas plantas acumuladoras de metales.

Se ha establecido que el Mn^{+2} libre en la célula es muy escaso y se acumula especialmente en organelos blancos, como son mitocondrias, cloroplastos, vesículas, vacuolas y aparato de Golgi (Pittman, 2005; Culotta y cols., 2005). Los factores homeostáticos incluyen transportadores de superficie celular e intracelulares y probables chaperonas que guían al Mn^{+2} a través de una vía de tráfico poco conocida, terminando

por último en la activación de las enzimas que requieren Mn^{+2} . Dado que el manganeso es potencialmente tóxico para la célula, en concentraciones elevadas, su ingreso y salida debe ser controlado cuidadosamente por proteínas reguladoras de la homeostasis. Hasta la fecha se han identificado sólo unos pocos participantes involucrados en esta red de tráfico del Mn^{+2} , tales como transportadores de la familia Nramp en *S. cerevisiae* encargados de ingresar el manganeso a la célula cuando está creciendo en niveles normales y de carencia de Mn^{+2} . Esta familia de transportadores de metales es altamente conservada desde bacterias hasta mamíferos superiores (Cullota y cols., 2005). En bacterias además de este tipo de transportadores para ingresar manganeso a la célula, se conocen también transportadores del tipo ABC que cumplen esta función en la membrana celular (Jakubovics y Jenkinson, 2001). En plantas en cambio, se conoce muy poco de los procesos involucrados en el transporte de manganeso y aunque se han encontrado diversos genes de proteínas de la familia Nramp y otras asociadas a transporte de metales, aún no se conoce un transportador específico para manganeso y sólo se han encontrado proteínas de este tipo capaces de transportar diversos cationes divalentes como Fe^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} . (Pitmann, 2005)

En cuanto a los mecanismos de regulación de la expresión de estas proteínas involucradas con el mantenimiento de la homeostasis del manganeso es menos aún lo que se sabe en células eucariontes.

En bacterias se conocen diversas formas de regulación de la expresión génica mediada por manganeso, como es el caso de la proteína Mur ("Manganese uptake regulator"), la que corresponde a una proteína reguladora de la expresión génica capaz

de cumplir esta función sólo al estar unida a Mn^{2+} . Este mecanismo fue estudiado en *Rhizobium leguminosarum* y es muy similar al encontrado en *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (Diaz-Mireles y cols., 2004; Diaz-Mireles y cols., 2005; Ikeda y cols., 2005; Bellini y cols., 2006). Mur es capaz de reprimir el operón sitABCD, el cual codifica para un sistema de transporte de Mn^{2+} , al unirse en condiciones de alto Mn^{2+} a dos sitios MRS (“*Mur-Responsive Sequence*”) presentes en la región promotora de este operón.

Sin embargo en células eucariontes es muy poco lo que se conoce del papel del Mn^{2+} como regulador de la expresión génica, y aunque se conocen diversos casos de cambios en la expresión de proteínas en respuesta a manganeso, no se ha podido dilucidar un mecanismo a nivel transcripcional que se relacione con este fenómeno. En levaduras está bien documentada la respuesta de los transportadores del tipo Nramp Smf1 y Smf2, proteínas que en condiciones de carencia de Mn^{2+} aumentan su expresión, en cambio al suplementar los medios de cultivo con Mn^{2+} disminuyen notablemente su expresión en la membrana plasmática. De manera interesante esta respuesta no es regulada a nivel transcripcional, sino que a nivel post-traducciona, siendo estas proteínas redirigidas a la vacuola en la cual son degradadas por proteasas vacuolares. (Van Ho y cols., 2002).

1.2. *Ceriporiopsis subvermispora* y la degradación de lignina

El organismo modelo usado por nuestro grupo es una especie eucariótica, el basidiomicete *Ceriporiopsis subvermispora*, hongo capaz de degradar lignina eficientemente.

La lignina de la madera es el segundo compuesto renovable más abundante sobre la tierra y el mayor compuesto aromático de la biosfera (Eriksson y cols., 1990). Esta es una macromolécula amorfa e irregular, altamente refractaria a la degradación y que constituye el sostén de las microfibrillas de celulosa en la madera, dándole rigidez y protección a las plantas.

Los hongos basidiomicetes denominados de pudrición blanca son los únicos capaces de mineralizar la lignina a dióxido de carbono y agua, de una forma eficiente y selectiva (Eggert y cols., 1997). Para ello poseen una maquinaria ligninolítica, la cual es inducida en estado de metabolismo secundario, es decir, en condiciones de carencia de nutrientes.

El hongo basidiomicete *Ceriporiopsis subvermispora* posee una gran eficiencia y selectividad para degradar a la lignina (Otjen y cols., 1987) utilizando para ello un sistema enzimático compuesto principalmente por dos enzimas: una manganeso peroxidasa (MnP) y una lacasa (Rüttimann y cols., 1992). La MnP es una hemoglobina que oxida Mn^{2+} a Mn^{3+} , el cual difunde y oxida a los residuos fenólicos que componen la lignina, la cual es codificada por 3 genes *mnp* en *C. subvermispora* (Lobos y cols., 1998; Tello y cols., 2000, 2001). La lacasa es una fenoloxidasas que contiene cobre en su sitio activo y que oxida directamente a los

residuos fenólicos utilizando O_2 como aceptor de electrones. Ambas actividades son secretadas como una familia de isoformas cuyo patrón de expresión varía de acuerdo a la composición del medio de cultivo del hongo (Lobos y cols., 1994; Salas y cols., 1995).

En *C. subvermipora* la actividad MnP en el medio extracelular es absolutamente dependiente de la presencia de Mn^{+2} en el medio de cultivo (Rüttiman y cols., 1992; Manubens y cols., 2003). Esto también ha sido descrito para otros hongos basidiomicetes ligninolíticos como *Trametes versicolor* (Johansson, 2002), *Phanerochaete chrysosporium* (Bonnarme y Jeffries, 1990; Brown y cols., 1991), *Pleurotus ostreatus* (Cohen y cols., 2002) y *Dichotomus squalens* (Perié y Gold, 1991). Sin embargo, en *C. subvermipora* es posible detectar los ARNm que codifican para MnP en ausencia de Mn^{+2} , es decir, en esta especie no existiría correlación entre la actividad extracelular de esta enzima y los niveles de ARNm de los genes *mnp*. Esto sugiere que el Mn^{+2} no tendría una participación directa en la regulación transcripcional de los genes *mnp*, aún cuando se ha descrito que los promotores de los genes *mnp* poseen elementos tipo MRE (“*Metal Responsive Elements*”) como los descritos por Thiele (1992) y que estarían involucrados en la regulación de la expresión génica modulada por metales como el manganeso. Recientemente y por primera vez se ha sugerido la existencia de nuevos elementos de respuesta a Mn^{+2} en promotores de genes *mnp* de *P. chrysosporium*, los cuales aún no están definidos en forma precisa y contundente (Ma y cols., 2004). Este último hallazgo sugiere la probable existencia de algún factor de transcripción que responde a este metal, ya que comúnmente los metales

ejercen su acción a través de factores de transcripción específicos que interactúan con secuencias presentes río arriba de los genes blanco.

Como se dijo anteriormente, en ausencia de Mn^{+2} los ARNm de *mnp1* y *mnp2* de *C. subvermispora* son detectados mediante Northern blot, pero no se detecta actividad enzimática de MnP extracelular. También se ha detectado que a bajas concentraciones de Mn^{+2} (10-20 μM) los niveles de ARNm de *mnp* son aún más altos y su abundancia se mantiene hasta 80 μM del metal, decayendo posteriormente a concentraciones de 160 y 320 μM de Mn^{+2} (Manubens y cols., 2003). Sin embargo, los niveles más altos de ARNm de *mnp* no se correlacionan con la actividad máxima alcanzada, ya que ésta es más alta a concentraciones entre 80 y 160 μM de Mn^{+2} a los 12 días de cultivo (Manubens y cols., 2003). Estos resultados en conjunto sugieren que el mecanismo de regulación del Mn^{+2} tiene un componente post transcripcional y que además existen factores adicionales que afectan la expresión de los genes *mnp*.

Este tipo de estudios de un análisis de gen por gen lamentablemente no han sido de gran ayuda para entender los efectos del cambio en la concentración de manganeso en el medio de cultivo, ya que esto debe afectar gran parte del metabolismo de la célula, por lo que se hace necesaria la búsqueda de una metodología capaz de entregarnos información más global de qué es lo que está sucediendo a nivel transcripcional en nuestro modelo de estudio en diferentes condiciones.

1.3. Genómica

Desde principios de los años noventa se han desarrollado e implementado novedosas tecnologías capaces de cambiar la forma de pensar de los científicos y cómo éstos enfrentan los problemas relacionados con el análisis de los cambios en la expresión génica. Antes del uso de estas herramientas la única manera en que se buscaba solución a problemas asociados a cambios de expresión en genes, era estudiando los genes de una manera reduccionista, es decir, gen por gen. Lamentablemente la gran cantidad y complejidad de problemas superaba por lejos la capacidad de estas técnicas para resolver las preguntas que surgían. El desarrollo de tecnologías para el estudio de la expresión génica de una manera global se hizo fundamental y es así como nacieron diversas técnicas capaces de realizar esta tarea, algunas basadas en amplificación por PCR y otras en la hibridación de moléculas de ácidos nucleicos. Hasta ahora la más conocida y sin duda poderosa es la tecnología de microarreglos de ADN (DNA *microarrays*), basada en la impresión de sondas (cientos o miles de ellas) en una placa para que éstas luego detecten las moléculas de interés a partir de las muestras que se deseen. Sin embargo esta técnica necesita conocimiento previo del genoma del organismo a estudiar y aún así es muy costosa si uno posee este tipo de información. Por estas razones se ha transformado en la opción elegida cuando se trata de estudiar cambios en la expresión génica en organismos modelos clásicos (Banerjee y Zhang 2002, Reijans y cols., 2003).

Otras técnicas han acompañado a los microarreglos en el estudio de la expresión génica, pero con estrategias más simples y menos costosas. Una de éstas es cDNA-AFLP (cDNA- *Amplified Fragment Length Polymorphism*), técnica basada en la

amplificación de fragmentos derivados de transcritos, que han sido generados mediante la digestión con dos enzimas de restricción, y posteriormente amplificados mediante PCR, para luego ser analizados en geles de acrilamida (Bachem y cols., 1996, 1998). Diversas son las publicaciones que comparan algunas de las técnicas más usadas como son DDRT-PCR (“*Differential Display Reverse Transcription- PCR*”), SAGE (“*Serial Analysis of Gene Expression*”) y microarreglos considerando los distintos factores que afectan a cada uno de los sistemas, tales como reproducibilidad, sensibilidad, cantidad de muestra (ARN) a utilizar, equipamiento necesario y costos.

El SAGE, método que proporciona datos cuantitativos concernientes con la expresión génica, se ha reportado como un método costoso y muy laborioso cuando se deben comparar muchas muestras en distintas condiciones, aunque no se hace necesario un conocimiento acabado del genoma del organismo a estudiar (Kuhn, 2001). El cDNA-AFLP es mucho menos costoso y se basa en el análisis mediante electroforesis en geles de secuencia de los perfiles de expresión génica generados mediante PCR, en que además la lectura densitométrica de las bandas también permite un análisis cuantitativo.

El DDRT-PCR es un método que tampoco necesita una gran cantidad de información previa, sin embargo tiene importantes limitaciones, tales como problemas de reproducibilidad, dificultad para la detección de mensajeros muy escasos y generación de falsos positivos (Bauer y cols., 1994; Bachem y cols., 1998). Los problemas del DDRT-PCR derivan fundamentalmente del uso de oligonucleótidos de secuencia al azar usados como partidores para PCR y de las temperaturas de apareamiento relativamente bajas necesarias para producir amplificadas. Estas

desventajas del DDRT-PCR han sido resueltas por el cDNA-AFLP utilizando partidores específicos y condiciones de alta estrictez, haciendo asimismo posible la verificación de la identidad de una banda de una manera simple y rápida. Además, el uso de oligonucleótidos oligo-dT para la síntesis del ADNc permite la detección de casi todos los transcriptos en un sistema biológico determinado, utilizando pequeñas cantidades de material de partida (Bachem y cols., 1998, Kuhn, 2001). Comparándola con la tecnología de microarreglos, cDNA-AFLP es una técnica más reproducible y más sensible, conjuntamente con las ventajas de tener un menor costo y no ser necesario tener un genoma previamente secuenciado según comparaciones cualitativas y cuantitativas realizadas, a pesar de tener la desventaja de generar menos información. (Donson y cols., 2002, Reijans y cols., 2003)

Por las razones expuestas cDNA-AFLP representa una buena opción para analizar en forma global los efectos del Mn^{2+} en la expresión génica en *Ceriporiopsis subvermispora*.

HIPÓTESIS

La expresión génica del basidiomicete *C. subvermispora* es afectada por la presencia de distintas concentraciones de Mn^{2+} en el medio de cultivo.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto diferencial en la expresión génica en respuesta a diferentes concentraciones de Mn^{2+} en el medio de cultivo en el basidiomicete *C. subvermispora*, mediante la técnica de cDNA-AFLP.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Montar la técnica de cDNA-AFLP para el estudio de la expresión diferencial en *C. subvermispora*.
2. Identificar genes expresados diferencialmente en respuesta a distintas concentraciones de Mn^{2+} , mediante la secuenciación de los fragmentos que muestren variaciones en respuesta a Mn^{2+} .
3. Validar mediante northern blot los datos obtenidos por cDNA-AFLP.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Cepa fúngica

Ceriporiopsis subvermispora cepa FP-105752 fue obtenida del Center for Mycology Research, CFMR (Forest Products Laboratory, Madison, WI, EEUU). Este hongo fue mantenido a 4 °C en placas de Petri con medio agar papa-dextrosa (39 g/L) Difco, (Sparks, MD, EEUU) y periódicamente fue traspasado a medio fresco.

2.1.2. Cepa bacteriana

Escherichia coli cepa DH5 α F' fue adquirida de Gibco BRL, Life Technologies (Gaithersburg, MD, EEUU). Esta cepa fue mantenida a -20°C en glicerol 50%.

2.1.3. Medios de cultivo

2.1.3.1. Medio de cultivo estacionario para *C. subvermispora*

El medio estacionario se utilizó para la propagación de este hongo y para la obtención del material inicial usado para la generación de los inóculos. Su composición es la siguiente: 2,0 g/L de KH₂PO₄, 0,5 g/L de MgSO₄, 0,1 g/L de CaCl₂, 10 g/L de glucosa, 1,74 g/L de ácido trans-aconítico (TAA) pH 4,5 usado como amortiguador, 1,0 g/L de tiamina-HCl, 0,2 g/L de tartrato de amonio, 0,2 mM de MnSO₄*H₂O y 1,0 mL/L de solución de elementos trazas. La solución de elementos trazas 1.000X, contenía por litro: 15 g de ácido nitrilotriacético, 1,0 g de FeSO₄*7H₂O, 0,85 g de CoCl₂*6H₂O, 1,0 g de ZnSO₄*7H₂O, 1,0 g de CuSO₄*5H₂O, 0,07 g de Al₂(SO₄)₃*18H₂O, 0,1 g de H₃BO₃, 0,1 g de Na₂MoO₄*2H₂O, 30 g de MgSO₄*7H₂O, 10 g de NaCl y 1,0 g de CaCl₂*2H₂O.

Una vez disueltos todos los componentes, la mezcla se autoclavó a 121 °C durante 30 min para su esterilización. Todos los componentes de este medio fueron adquiridos de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EEUU) o de Merck (Darmstadt, Alemania).

2.1.3.2. Medio de cultivo estándar para *C. subvermispora*

El medio estándar se utilizó para el crecimiento del hongo con agitación y su composición es la siguiente: 2,0 g/L de KH_2PO_4 , 0,5 g/L de MgSO_4 , 0,1 g/L de CaCl_2 , 10 g/L de glucosa, 1,74 g/L de ácido trans-aconítico (TAA) pH 4,5 usado como amortiguador, 1,0 g/L de tiamina-HCl, 2 g/L de tartrato de amonio, 0,1 % de Tween 20 y 1,0 mL/L de solución de elementos trazas. La mezcla fue autoclavada a 121 °C durante 30 min para su esterilización. Todos los componentes fueron adquiridos de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) o de Merck (Darmstadt, Alemania). Las variaciones en la concentración de Mn^{2+} (0,02 mM, 0,16 mM y 0,32 mM) en los experimentos se realizaron manteniendo constante el resto de los componentes del medio estándar.

2.1.3.3. Medio de cultivo para bacterias

Las cepas de *E. coli* DH5 α F' fueron cultivadas en caldo Luria: 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl, pH 7,0 ajustado con NaOH y suplementado con 1 g/L de glucosa. En el caso de medios sólidos se usó como agente solidificante agar-agar en una proporción de 15 g/L. Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 30 min. Cuando se utilizó el antibiótico ampicilina para preparar medios selectivos, se esterilizó una solución de 100 mg/mL mediante filtración y se agregó a la mezcla autoclavada antes de su uso a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. En algunos casos se utilizó IPTG y/o X-Gal a

concentraciones finales de 0,5 mM y 40 µg/mL, respectivamente. El agar-agar, la triptona y el extracto de levadura fueron obtenidos de Difco (Sparks, MD, EEUU). Las sales y la ampicilina de Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO, EEUU). El IPTG y X-Gal se obtuvieron de US Biological (Swampscott, MA, EEUU). El resto de los componentes proviene de Merck (Darmstadt, Alemania).

2.1.4. Plasmidios

En el transcurso de esta tesis se utilizaron los plasmidios pGEM-T Easy Vector System de Promega (Madison, WI, EEUU) y pCR2.1-TOPO de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU).

2.1.5. Enzimas

Para los procedimientos se utilizaron las enzimas de restricción *EcoRI*, *VspI* y *TaqI* obtenidas de Promega (Madison, WI, EEUU). También se utilizó ADN polimerasa *Taq*, ADN polimerasa I, ARNasa H y transcriptasa inversa “SuperScript II” obtenidas de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU).

2.1.6. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados durante esta tesis se muestran en la tabla 1. Todos fueron obtenidos de Integrated DNA Technologies , IDT, (Coralville, IA, EEUU).

Tabla N°1. Oligonucleótidos utilizados.

Nombre del partidor	Secuencia nucleotídica
Oligo(dT)25V	5' TTTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT V 3'
A-TOP	5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3'
A-BOT	5' TAG GTA CGC AGT C 3'
A-0	5' CTC GTA GAC TGC GTA CCT AAT 3'
A-NN	Los siguientes partidores poseen 2 nucleótidos selectivos
A-AA	5' GAC TGC GTA CCT AAT AA 3'
A-AC	5' GAC TGC GTA CCT AAT AC 3'
A-AG	5' GAC TGC GTA CCT AAT AG 3'
A-AT	5' GAC TGC GTA CCT AAT AT 3'
A-CA	5' GAC TGC GTA CCT AAT CA 3'
A-CC	5' GAC TGC GTA CCT AAT CC 3'
A-CG	5' GAC TGC GTA CCT AAT CG 3'
A-CT	5' GAC TGC GTA CCT AAT CT 3'
A-GA	5' GAC TGC GTA CCT AAT GA 3'
A-GC	5' GAC TGC GTA CCT AAT GC 3'
A-GG	5' GAC TGC GTA CCT AAT GG 3'
A-GT	5' GAC TGC GTA CCT AAT GT 3'
A-TA	5' GAC TGC GTA CCT AAT TA 3'
A-TC	5' GAC TGC GTA CCT AAT TC 3'
A-TG	5' GAC TGC GTA CCT AAT TG 3'
A-TT	5' GAC TGC GTA CCT AAT TT 3'
T-TOP	5' GAC GAT GAG TCC TGA C 3'
T-BOT	5' CGG TCA GGA CTC AT 3'
T-0	5' GAC GAT GAG TCC TGA CCG A 3'
T-NN	Los siguientes partidores poseen 2 nucleótidos selectivos
T-AA	5' GAT GAG TCC TGA CCG AAA 3'
T-AC	5' GAT GAG TCC TGA CCG AAC 3'
T-AG	5' GAT GAG TCC TGA CCG AAG 3'
T-AT	5' GAT GAG TCC TGA CCG AAT 3'
T-CA	5' GAT GAG TCC TGA CCG ACA 3'
T-CC	5' GAT GAG TCC TGA CCG ACC 3'
T-CG	5' GAT GAG TCC TGA CCG ACG 3'
T-CT	5' GAT GAG TCC TGA CCG ACT 3'
T-GA	5' GAT GAG TCC TGA CCG AGA 3'
T-GC	5' GAT GAG TCC TGA CCG AGC 3'
T-GG	5' GAT GAG TCC TGA CCG AGG 3'
T-GT	5' GAT GAG TCC TGA CCG AGT 3'
T-TA	5' GAT GAG TCC TGA CCG ATA 3'
T-TC	5' GAT GAG TCC TGA CCG ATC 3'
T-TG	5' GAT GAG TCC TGA CCG ATG 3'
T-TT	5' GAT GAG TCC TGA CCG ATT 3'
Cs2AC2Fw	5' ATC CCG CTG CAC AAG ATT CAG A 3'
Cs2AC2Rv	5' TCG TGT GTT GGC CTG TAC TTC A 3'
GAPDFw	5' CCT GCA CCA CCA ACT GCC T 3'
GAPDRv	5' TCG TCC TCG GTG TAG CCC GA 3'

2.1.7. Sistemas comerciales

2.1.7.1. Purificación de ADN de la mezcla de PCR

Se usó el sistema “EZNA Cycle pure kit” de Omega Bio-Tek Inc. (Doraville, GA, EEUU).

2.1.7.2. Extracción de ADN plasmidial de *E. coli*

Se utilizó el sistema “QIAprep Spin Miniprep Kit” de QIAGEN (Valencia, CA, EEUU).

2.1.7.3. Purificación de ARNm poli(A)

Se utilizó el sistema “Dynabeads® mRNA Purification Kit” de Dynal (Oslo, Noruega)

2.1.8. Reactivos radioactivos

El desoxirribonucleótido [α -³²P]-dCTP y el ribonucleótido [γ -³²P]-ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) se obtuvieron de Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA, EEUU).

2.1.9. Reactivos generales

El papel Miracloth fue obtenido de Calbiochem (San Diego, CA, EEUU). Las membranas de transferencia usadas fueron GeneScreen Plus de Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA, EEUU). El resto de las sales, reactivos líquidos y compuestos orgánicos fueron adquiridos de Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO, EEUU), de Merck (Darmstadt, Alemania) o de Fluka Chemie (Buchs, Suiza).

2.1.10. Material fotográfico

Para las fotografías en blanco y negro se utilizaron películas Polapan 667 de Polaroid (Cambridge, MA, EEUU). Las películas para autorradiografía que se utilizaron fueron XAR-5, BioMax MS y BioMax MR de Eastman Kodak Company (Rochester, NY, EEUU).

2.2. Métodos

2.2.1. Condiciones de cultivo

2.2.1.1. Crecimiento de *C. subvermispora* en medio estacionario

Debido a que este hongo no produce esporas en las condiciones experimentales en que se mantiene en el laboratorio, fue necesario utilizar micelio molido como inóculo.

C. subvermispora fue cultivado en medio sólido en placas de Petri con agar papa dextrosa durante 10 días en una estufa a 28 °C. Una vez crecido, se utilizaron trozos de agar de aproximadamente 1 cm² para inocular matraces de 500 mL con 25 mL de medio estacionario.

Después de cultivar el hongo durante aproximadamente 14 días a 28 °C y sin agitación, el micelio fue recolectado en un frasco de 100 mL que contenía 15 g de esferas de vidrio de 5 mm de diámetro estériles. Mediante una fuerte agitación se molió el micelio hasta obtener una suspensión homogénea. Se agregaron alícuotas de 0,2 mL de este micelio molido sobre discos de papel filtro de 2 cm de diámetro previamente pesados y se secaron en una estufa a 80 °C durante dos horas para determinar el peso

seco correspondiente al micelio presente en el medio estacionario. Este micelio molido fue utilizado para inocular el medio estándar.

2.2.1.2. Crecimiento de *C. subvermispora* en medio estándar

Se inocularon 45 mg (determinados como peso seco en el punto anterior) de micelio molido, obtenido a partir de cultivos estacionarios, en 100 mL de medio de cultivo estándar contenidos en matraces de 250 mL. Los cultivos se efectuaron en un agitador orbital con una agitación constante de 180 rpm a 28 °C. Después de 10 días, los cultivos fueron cosechados mediante filtración al vacío a través de papel Miracloth, congelados inmediatamente en N₂ líquido y almacenados a -70 °C.

Se realizaron ensayos en 4 condiciones de cultivo variando solamente la concentración de manganeso, las que fueron 0 μM, 20 μM, 160 μM y 320 μM. Además se realizaron ensayos en condiciones de 20 μM de manganeso a los que luego de su cultivo de diez días se les agregó manganeso hasta una concentración de 160 μM y se cosechó a los 30, 60 y 120 minutos posteriores a la suplementación.

2.2.2. Montaje de técnica cDNA-AFLP para *C. subvermispora*

2.2.2.1. Extracción de ARN desde micelio congelado

El micelio congelado en nitrógeno se molió mediante mortero hasta obtener un fino polvo blanco. A una cantidad de aproximadamente 0,75 mL (medido en un tubo eppendorf) de micelio molido se le agregó 1,6 mL de tampón de extracción frío (Clorhidrato de guanidina 6 M, Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM y β-mercaptoetanol 50

mM) y se homogeneizó invirtiendo los tubos unas 10 veces. Esta mezcla se separó en dos tubos y a cada uno se le agregó 1 volumen de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25 : 24 : 1) saturado en agua, se agitó mediante vortex durante 10 segundos y se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos. Luego de separar la fase acuosa se repitió el procedimiento 2 veces, para luego agregar 1 volumen de cloroformo : alcohol isoamílico (24 : 1), agitar y centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos. En seguida se separó la fase acuosa y se le agregó a esta 1/10 de volumen de solución de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, para precipitar el ARN a -70 °C durante 30 minutos o toda la noche a -20 °C. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se lavó con 0,2 mL de etanol 70% frío, se centrifugó 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se secó el sedimento sobre un papel absorbente durante 15 minutos. Esto se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas (0,1% DEPC). Para analizar la integridad de los ARNs extraídos se corrió un gel de agarosa/formaldehído al 1,2% con 10 µg de ARN cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm.

2.2.2.2. Purificación de ARNs poli(A)

A partir de 75 µg de ARN total extraído anteriormente, se procedió a extraer una fracción rica en ARN poli(A) mediante captura magnética utilizando el sistema comercial “Dynabeads® mRNA Purification Kit” el cual mediante partículas magnéticas unidos a oligo(dT) permite enriquecer nuestra solución en ARNm.

2.2.2.3. Síntesis de ADNc de doble hebra

Luego de obtener los ARNm, se utilizó 10 μL (1 μg de ARNm) de esta solución para la síntesis del ADNc. Para sintetizar la primera hebra se preparó una reacción de transcripción inversa utilizando la enzima *SuperScript II* en el medio y con las condiciones de temperatura recomendadas por el fabricante y utilizando como partidor el oligo(dT)₂₅V (2 ng/ μL). Para la síntesis de la segunda hebra a esta mezcla de reacción se le agregó 35 U de ADN polimerasa I, 15 U de ARNasa H, 25 μmoles de nucleótidos, 150 μmoles de DTT, 15 μL de un tampón 10X (Tris-HCl 200 mM, KCl 750 mM, (NH₃)₂SO₄ 100 mM, MgCl₂ 50 mM, DTT 10 mM) y se llevó a 150 μL finales con agua, reacción que se incubó 2 horas a 16°C. Para analizar la calidad del producto se analizaron 5 μL de esta en un gel de agarosa 1%, para luego ser purificado mediante el sistema comercial “EZNA Cycle pure kit” y eluidos con 40 μL de agua.

2.2.2.4. Digestión con enzimas de restricción

20 μL de los ADNc preparados anteriormente se digirieron con 10 U de la enzima de restricción *TaqI* en una reacción de 40 μL con el tampón indicado por el fabricante y BSA durante 1 hora a 65°C. Luego a esta reacción se le agregó 10 U de *VspI*, el tampón indicado por el fabricante, BSA y agua hasta 50 μL totales, reacción que se incubó durante 1 hora a 37°C.

2.2.2.5. Preparación y ligación de adaptadores

Se prepararon dos adaptadores, uno con un extremo complementario a la secuencia de corte de *TaqI* y el otro con un extremo complementario a la de *VspI*. Para esto se diseñaron 2 parejas de oligonucleótidos (según el protocolo de Bachem y cols.,

1996) complementarios entre sí, A-TOP con A-BOT y T-TOP con T-BOT. Las secuencias se muestran en la figura N°1. Para el apareamiento se incubaron cantidades iguales de cada uno de los adaptadores en un tampón Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 50 mM y EDTA 1 mM, solución que se calentó a 95°C mediante un “*heatblock*” el cual se apagó para enfriar muy lentamente hasta temperatura ambiente. De una solución 50 pM de adaptadores se tomó 1 µL de cada uno de estos adaptadores y se incubaron con toda la reacción de digestión de ADNc y 400 U de ADN ligasa de fago T₄, incubando 2 horas a T° ambiente. El producto de esta reacción se denominó templado primario.

Adaptador A-TOP/A-BOT	5'-CTCGTAGACTGCGTACC CTGACGCATGGAT- 5'
Adaptador T-TOP/T-BOT	5'-GACGATGAGTCCTGAC TACTCAGGACTGGC- 5'

Figura N°1. Esquema de la estructura de los adaptadores utilizados para cDNA-AFLP.

Los adaptadores luego de ser alineados fueron ligados al ADNc digerido por las enzimas *TaqI* y *VspI*, para luego ser amplificados en la etapa de preamplificación

2.2.2.6. Pre-Amplificación mediante PCR

Utilizando 100 ng de cada partidor (A-0 y T-0) y 10 µL de templado primario se llevó a cabo una reacción de PCR en presencia de 1 mM de MgCl₂, 125 µM de cada dNTP, y 2,5 U de ADN polimerasa *Taq*, mediante un programa de 25 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94 °C durante 30 segundos, alineamiento a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto.

2.2.2.7. Marcación radioactiva de partidores para amplificación selectiva

Para la etapa posterior de amplificación selectiva la marca radioactiva se agregó mediante la marcación del partidor en el extremo 5'. La reacción de fosforilación necesaria para llevar a cabo una reacción de amplificación posteriormente contenía 10 pmol de partidor A-NN, 1 U de quinasa de fago T₄, y 10 pmol de γ -³²P-ATP, en un volumen final de 2,5 μ L, reacción que fue escalada hasta 10 veces según la cantidad a utilizar.

2.2.2.8. Amplificación selectiva mediante PCR

De una dilución 50X de la reacción de pre-amplificación se utilizaron 5 μ L para la reacción de amplificación selectiva en presencia de un partidor A-NN previamente marcado radioactivamente y uno T-NN no marcado (25 nM final) (ver tabla N°1). Las concentraciones de los otros reactivos fueron similares a los de la pre-amplificación.

El protocolo usado para el termociclador comprende 11 ciclos de un protocolo tipo “*touchdown*”: en el paso de desnaturalización se llevó a cabo a 94°C durante 30 segundos, el alineamiento se llevó a cabo durante 30 segundos partiendo de una temperatura de 65°C y disminuyendo 0,7°C por cada ciclo y la extensión fue de 1 minuto a 72°C. Luego se realizaron 24 ciclos con desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 56°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto.

2.2.2.9. Visualización de cDNA-AFLP

A 3 μ L de la reacción de amplificación selectiva se le agregaron 2 μ L de “*Stop Mix Solution*” (NaOH 10 mM, formamida 95%, azul de bromofenol 0,05% y xilencianol 0,05%). Esto se cargó en geles de secuenciación (acrilamida 6%, Urea 7 M) y se

realizó la electroforesis durante aproximadamente 2 horas. Luego los geles se secaron en papeles Whatmann 3MM en un secador de geles Bio-Rad durante 30 minutos y se colocaron en contacto con una película Kodak X-OMAT AR durante 10-36 horas, las que luego fueron reveladas.

2.2.3. Identificación de TDFs visualizados mediante cDNA-AFLP

2.2.3.1. Aislamiento y reamplificación de TDFs

Las bandas elegidas se cortaron directamente del gel utilizando como referencia la autoradiografía, y se incubaron a 65 °C en 100 µL de tampón TE (Tris-HCl 1M, EDTA 50 mM, pH 8,0) durante 2 horas, agitando periódicamente en vortex.

La reacción de reamplificación se realizó con 5 µL de eluido utilizando el mismo protocolo indicado en 2.2.2.6 pero utilizando un partidor A-0 y otro T-NN, y aumentando los ciclos a 30.

2.2.3.2. Purificación de fragmentos amplificados por PCR

Para la purificación de los amplificados se utilizó el sistema comercial “EZNA Cycle pure kit”. El producto obtenido luego fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.

2.2.3.3. Ligación de amplificados de PCR al vector pCR2.1-TOPO TA

Para la ligación del fragmento amplificado por PCR al vector seleccionado se siguió las instrucciones del fabricante utilizando 3 µL del producto de PCR purificado. En algunos casos por razones de disponibilidad se utilizó el plasmidio pGEM-T Easy

Vector System de Promega, con el cual se llevó a cabo la ligación con la misma cantidad de producto PCR antes mencionada y siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.3.4. Preparación de células electrocompetentes y transformación de *E. coli* mediante electroporación

A partir de 500 mL de cultivo de *E. coli* en medio LB incubado hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a 600 nm, se procedió con la preparación de las bacterias electrocompetentes. Para esto se incubó el cultivo en hielo y cámara fría durante 30 minutos para después centrifugar a 6000 g durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se agregó 500 mL de H₂O destilada fría y estéril. Este procedimiento se realiza 4 veces disminuyendo el volumen a 250 mL, 125 mL, 20 mL resuspendiendo el último sedimento en 2 mL de glicerol 10% frío y estéril, para posteriormente almacenar las células a -70 °C en alícuotas de 50 µL.

2.2.3.5. Extracción de ADN plasmidial para secuenciación

Para realizar las extracciones de ADN plasmidial se utilizó el sistema “QIAprep Spin Miniprep Kit” de QIAGEN. Las preparaciones de plasmidios se cuantificaron espectrofotométricamente y se comprobó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

2.2.3.6. Análisis bioinformático de secuencias obtenidas.

Para el análisis bioinformático se utilizaron diversas herramientas de distintos servidores: del servidor del NCBI se utilizaron la herramienta BLAST (blastn, tblastx, y blastp) y las herramientas de predicción de dominios conservados “*Conserved Domain Search*” (www.ncbi.nlm.nih.gov). La herramienta BLAST también se utilizó desde el

servidor del genoma de *P. chrysosporium* (<http://genome.jgi-psf.org/Phchr1/Phchr1.home.html>). Para la búsqueda de posibles dominios de transmembrana se utilizó el servidor TMHMM v2.0 disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM> de la Universidad Técnica de Dinamarca. Con el fin de determinar la posible localización subcelular de la proteína problema se utilizaron las herramientas PSORT v2 disponible en <http://bioweb.pasteur.fr/cgi-bin/seqanal/psort2.pl> servidor del Instituto Pasteur, Francia y la herramienta ESLpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/index.html>) del servidor del Instituto de Tecnología Microbiana, India. Para realizar los análisis de posibles estructuras terciarias se utilizó el servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/> , SIB - Biozentrum Basel, Suiza).

2.2.3.7. Geles desnaturantes para ARN y Northern blot.

Luego de obtener el ARN total, se cuantificó por espectrofotometría y se corroboró la integridad de éste mediante electroforesis en geles de agarosa / formaldehído al 1,2 % cargando 10 µg de muestra por carril. Para la hibridación tipo Northern se realizó todo el procedimiento usando las indicaciones del fabricante de las membranas utilizadas (GeneScreen Plus, Perkin Elmer).

La amplificación de las sondas utilizadas se realizó mediante PCR utilizando 25 µM de cada partidor (GAPDFw y GAPDRv, para GAPDH ; Cs2AC2Fw y Cs2AC2Rv para el fragmento Cs2AC2) y 10 ng de templado primario. Se llevó a cabo una reacción de PCR en presencia de 1 mM de MgCl₂, 20 µM de dATP, dTTP y dGTP, 2,5 U de ADN polimerasa *Taq* y 35 µCi de [α -³²P]-dCTP, mediante un programa de 35 ciclos con

temperatura de desnaturación de 94 °C durante 30 segundos, alineamiento a 58 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos. Para la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas se utilizó el programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, EEUU).

3. RESULTADOS

3.1. Cultivos y preparación del material biológico

Para llevar a cabo la búsqueda de genes expresados diferencialmente en respuesta a cambios en la concentración de Mn^{2+} , se cultivó el hongo *C. subvermispora* en medio líquido durante 10 días en presencia de diferentes concentraciones del metal. Las concentraciones elegidas fueron 0 μM , 20 μM , 160 μM y 320 μM , además de tres cultivos crecidos durante 10 días en 20 μM a los cuales se suplementó con 140 μM de Mn^{2+} y luego incubó durante 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos adicionales para estudiar el efecto del aumento en la concentración de Mn^{2+} en la expresión génica en condiciones de deficiencia de este metal.

Luego de cosechar el hongo cultivado durante 10 días en medio líquido, se procedió con la extracción de ARN y la posterior cuantificación y visualización de la integridad de estos mediante un gel de agarosa/formaldehído al 1,2% (Figura 1). Al comprobar la integridad y la cantidad de ARN total obtenido se continuó con la extracción de ARN mensajeros mediante *Dynabeads* para la posterior síntesis de ADNc de doble hebra.

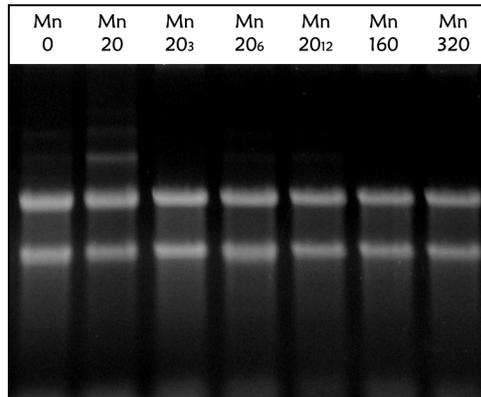


Figura N°2. Visualización de ARN total obtenido.

En los diferentes carriles de un gel de agarosa/formaldehído al 1,2%, se cargó 10 µg de ARN total obtenido. La integridad de estos se puede comprobar visualizando la presencia de los ARN ribosomales, los que corresponden a las dos bandas más abundantes. En la parte superior se indica la concentración de Mn²⁺ en la que fue extraída cada muestra de ARN. Los subíndices 3, 6 y 12 indican los tiempos que duró el cultivo con el pulso, 30, 60 y 120 minutos, respectivamente.

3.2. Montaje de técnica de cDNA-AFLP

En la Figura N°3 se esquematiza los procedimientos necesarios para realizar un estudio por cDNA-AFLP. Luego de obtener el ADNc doble hebra total, este es digerido mediante las enzimas de restricción *TaqI* y *VspI*. Los fragmentos obtenidos son ligados a los adaptadores y amplificados mediante PCR en la etapa de pre-amplificación utilizando los partidores A-0 y T-0.

En la Figura N°4 se muestra el resultado de la etapa de preamplificación con partidores específicos para los adaptadores previamente ligados a los fragmentos digeridos. Se observa que la población de amplificados presenta un tamaño entre los 100 pares de bases y los 700 pares de bases aproximadamente y que la cantidad de éstos es relativamente equivalente. Luego de esta etapa las reacciones de preamplificación son

diluidas 50 veces y usadas como templado para las reacciones de amplificación selectiva, donde se lleva a cabo la amplificación los partidores selectivos A-NN y T-NN.

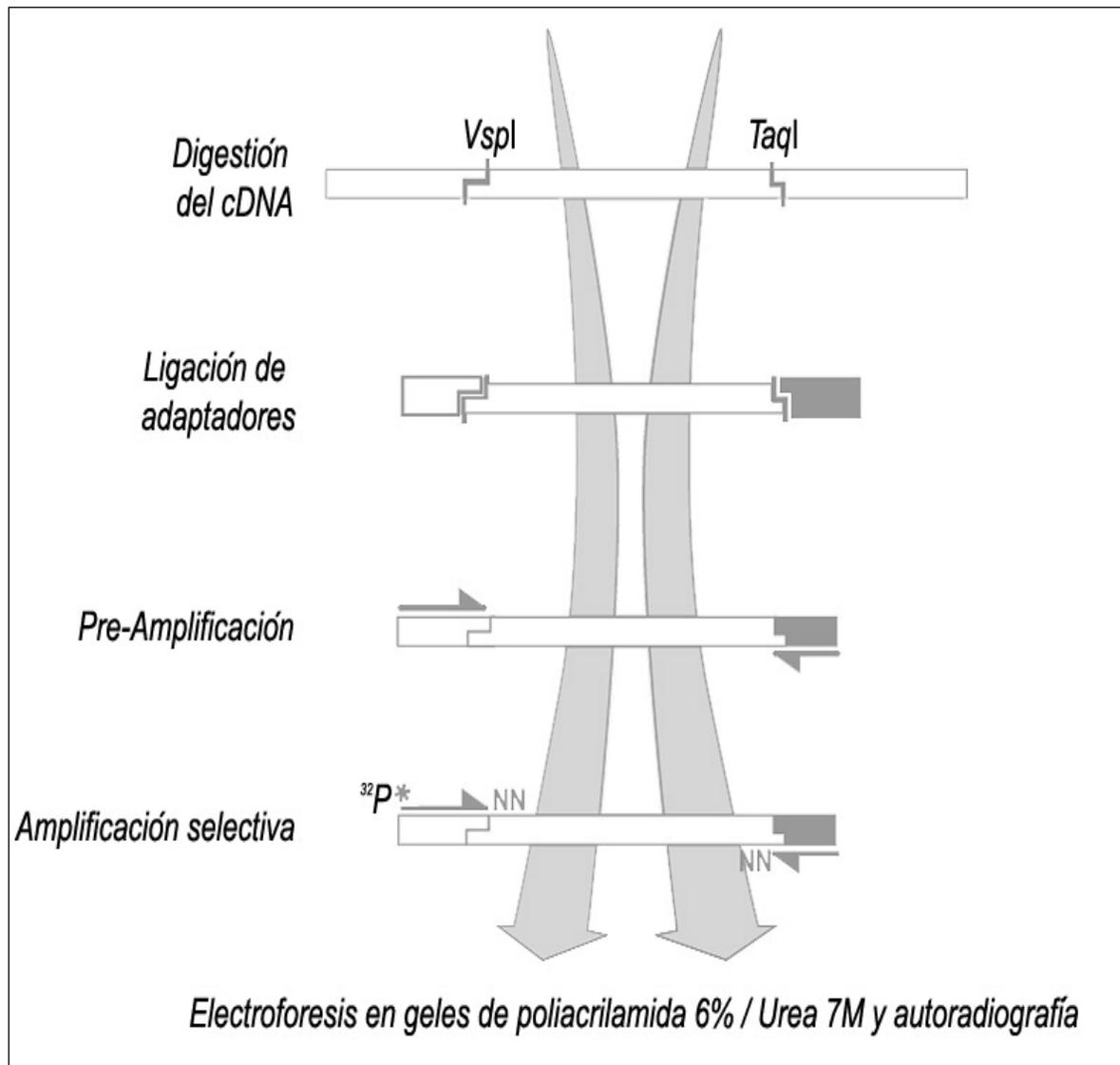


Figura N°3. Esquema de la técnica de cDNA-AFLP

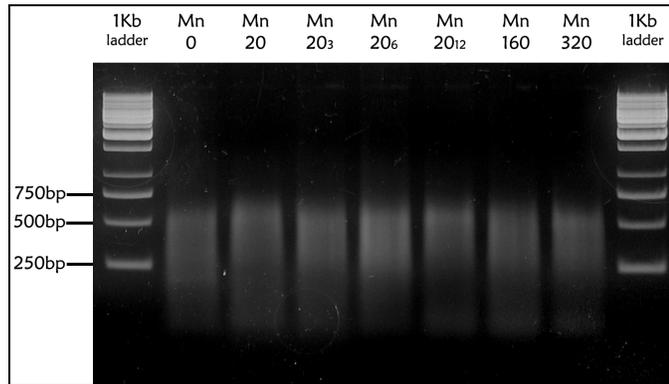


Figura N°4. Visualización de productos de PCR obtenidos tras la etapa de preamplificación.

En un gel de agarosa al 1,5% se cargaron 5µL de producto de PCR obtenido luego de la etapa de preamplificación. Se puede apreciar que la mayor parte de los fragmentos amplificados se encuentra entre los 100 y 700 pares de bases. En la parte superior se indican concentraciones de Mn^{2+} en el medio de cultivo de las cuales se obtuvo dichas muestras. Los subíndices 3, 6 y 12 indican los tiempos que duró el cultivo con el pulso, 30, 60 y 120 minutos respectivamente

Se utilizaron dos condiciones en el proceso de selección de las mejores parejas de partidores para utilizar en este estudio (0 µM y 160 µM de Mn^{2+}). Se analizaron los amplificados generados por las 256 parejas de partidores posibles combinando los partidores para los adaptadores *VspI* y *TaqI* con dos nucleótidos adicionales en el extremo 3' , denominados A-NN y T-NN, (16 combinaciones de cada uno) en la reacción de PCR. El partidore complementario a la secuencia del adaptador *VspI* fue marcado en su extremo 5' con ^{32}P -γ-ATP mediante quinasa de fago T₄ para su posterior visualización.

El criterio utilizado para la selección de las parejas de partidores a utilizar posteriormente, fue principalmente el número de bandas generadas y la presencia de

bandas expresadas constitutivamente. El número de bandas ideal para este tipo de estudio es de aproximadamente 50, debido a que en menor número se puede cometer errores debido a la falta de bandas presentes constitutivamente en todas las condiciones. Si el número de bandas es mayor puede ser confuso y difícil determinar cuando hay más de una banda en una zona. Un ejemplo del tipo de gels que resultaron de este procedimiento se muestra en la Figura N°5 donde se puede observar partidores que cumplieran con el criterio de selección (A) y otros que no fueron utilizados (B).

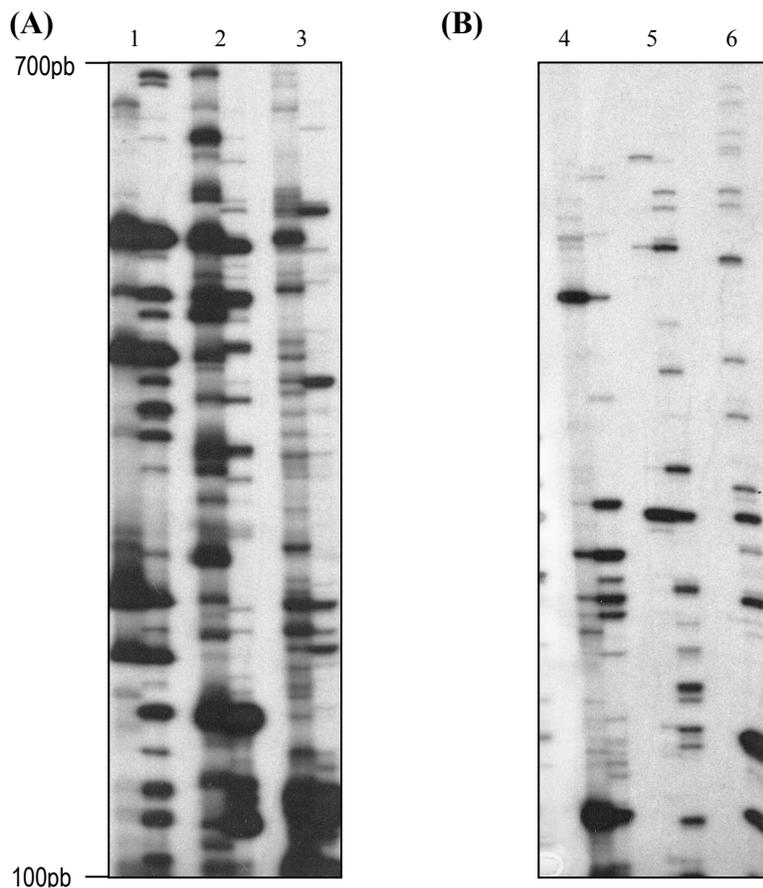


Figura N°5. Elección de parejas de partidores a utilizar para el análisis por cDNA-AFLP.

Se cargaron 3 μ L de reacción de amplificación selectiva en un gel de poliacrilamida 6% / Urea 7M. En los carriles del 1 al 6 se muestran 6 amplificaciones usando distintas parejas de partidores.

- (A) Ejemplo de parejas de partidores que entregan un número adecuado de bandas.
- (B) Ejemplo de parejas de partidores con un número insuficiente de bandas para ser utilizados.

Se seleccionaron finalmente diez parejas de partidores diferentes generando así alrededor de 500 bandas para analizar. En la Tabla N°2 se encuentran los nombres y secuencias de los partidores que finalmente fueron seleccionados para llevar a cabo este estudio mediante cDNA-AFLP.

Nombre del partidor	Sigla	Secuencia nucleotídica
A-CC	A	5' GAC TGC GTA CCT AAT CC 3'
T-AA	B	5' GAT GAG TCC TGA CCG AAA 3'
T-AC	C	5' GAT GAG TCC TGA CCG AAC 3'
T-AG	D	5' GAT GAG TCC TGA CCG AAG 3'
T-AT	E	5' GAT GAG TCC TGA CCG AAT 3'
T-CA	F	5' GAT GAG TCC TGA CCG ACA 3'
T-CC	G	5' GAT GAG TCC TGA CCG ACC 3'
T-CT	H	5' GAT GAG TCC TGA CCG ACT 3'
T-GA	I	5' GAT GAG TCC TGA CCG AGA 3'
T-GC	J	5' GAT GAG TCC TGA CCG AGC 3'
T-GG	K	5' GAT GAG TCC TGA CCG AGG 3'

Tabla N°2. Oligonucleótidos seleccionados para realizar el análisis por cDNA-AFLP. Las parejas elegidas fueron el partidor A-CC en combinación con cada uno de los partidores T-NN indicados. Las siglas se utilizarán para nombrar los fragmentos obtenidos de cada combinación de partidores.

3.3. Análisis mediante cDNA-AFLP

A partir de las diez parejas de partidores seleccionadas se generaron alrededor de 500 bandas de las cuales al menos 30 correspondieron a bandas de posibles genes expresados constitutivamente por la cantidad y el patrón que presentaron. 65 bandas presentaron las características que se buscaban, ya sea ser reprimidas o inducidas por la adición de Mn^{2+} . En la Figura N°6 podemos ver dos ejemplos de patrones generados luego de la amplificación selectiva utilizando los partidores A-CC/T-AC (A) y A-CC/T-

AG (B) en los que se indican algunos ejemplos de bandas de interés que se aislaron posteriormente.

Se reamplificaron 34 bandas para su posterior clonamiento y secuenciación, parte de las bandas no pudieron ser reamplificadas. La Figura N°6 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en la etapa de reamplificación. Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el plasmidio pCR2.1-TOPO TA y luego secuenciados.

En la Tabla N°3 se encuentran los nombres asignados a cada banda aislada con los patrones de expresión obtenidos mediante la amplificación selectiva.

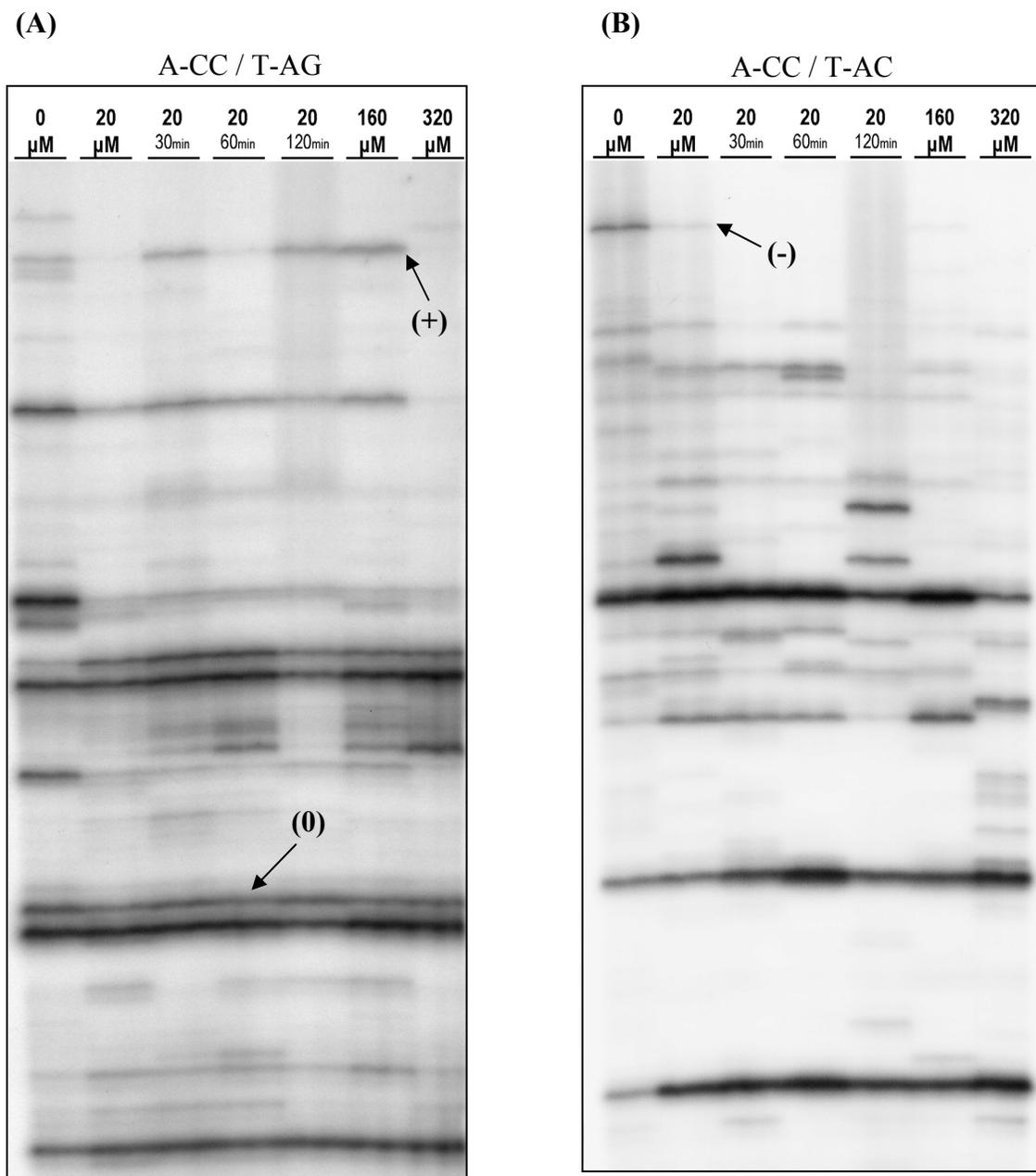


Figura N°6. Análisis de patrones de expresión mediante la técnica de cDNA-AFLP.

(A) Patrón generado mediante la amplificación por PCR usando los partidores A-CC/T-AG

(B) Patrón generado mediante la amplificación por PCR usando los partidores A-CC/T-AC

Los símbolos (+), (-) y (0) representan ejemplos de fragmentos que aumentan, disminuyen o mantienen su expresión respectivamente. En la parte superior se indica la concentración de Mn^{2+} de las que fueron obtenidas las muestras respectivas.

TDF's	$\mu\text{M Mn}^{2+}$						
	0	20	203	206	2012	160	320
Cs2AB1	-	-	-	+	+	++	++
Cs2AB2	-	-	-	-	+	+	++
Cs2AB3	-	-	-	-	-	-	+
Cs2AB4	-	-	+	+	++	++	+++
Cs2AB5	-	-	-	+	++	++	+
Cs2AF1	-	-	-	-	++	++	+++
Cs2AF2	-	-	-	-	++	+++	++
Cs2AF3	-	-	+	++	+++	+++	++
Cs2AF5	-	-	+	+	+	+	++
Cs2AC1	-	-	-	+	+	-	-
CsAC7	+	++	++	++	+	+	-
Cs2AD2	+		++	++	+	+	-
Cs2AF6	-	++	+	+	-	-	-
Cs2AG1	-	-	-	-	-	+	-
Cs2AG3	-	-	-	+	-	-	-
Cs2AG4	+	++	+	+	+	+	+
Cs2AG5	-	-	+	+	+	+	-
Cs2AH1	++	+	+	-	-	+	++
Cs2AH2	-	-	-	-	+	+	-
Cs2AH3	-	+	+	-	+	+	+
Cs2AH4	+	+	+	++	+	+	+
Cs2AJ1	+	+	+	++	+	+	-
Cs2AJ2	++	++	+	+	+	+	+
Cs2AJ3	+	+	+	++	+	+	+
Cs2AE1	-	-	++	+	+	-	-
Cs2AE3	-	-	++	+	+	-	+
Cs2AE4	-	-	+	-	-	-	+
Cs2AC2	++	+	-	-	-	+	-
Cs2AD1	++	+	-	-	-	-	-
Cs2AG2	++	++	+	+	+	+	-
Cs2AK1	++	++	++	+	+	-	-
Cs2AK3	++	+	+	-	-	-	-
Cs2AK4	+	+	+	+	-	-	-
Cs2AE2	+	-	-	-	-	-	-

Tabla N°3. Fragmentos obtenidos mediante cDNA-AFLP cuya expresión varía en función de la concentración de Mn^{2+} en el medio de cultivo.

Los fragmentos fueron nombrados de acuerdo a la pareja de partidores con la que se amplificaron, A corresponde al partidor A-CC, la letra continuación corresponde al partidor T-NN usado. Por ejemplo Cs2AC1 corresponde al primer fragmento aislado de una muestra amplificada con los partidores A-CC y T-AC y así sucesivamente en el orden de la Tabla N°2. En verde claro se muestran los TDFs que aumentaron su expresión al agregar Mn^{2+} , en naranja los que se reprimieron y los amarillos cambiaron su expresión de manera irregular.

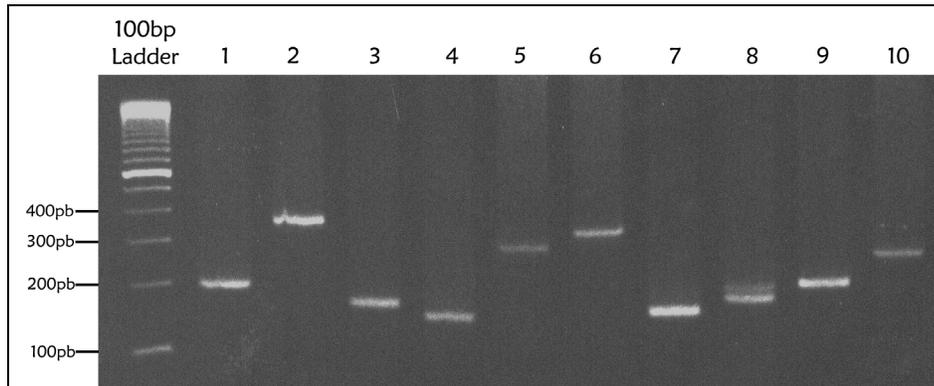


Figura N°7. Visualización de diversos fragmentos reamplificados obtenidos de geles de cDNA-AFLP.

En un gel de agarosa al 2,5% se cargaron 5 µL de reacción de reamplificación.

3.4. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en una primera instancia utilizando la herramienta BLAST (blastn, blastx, tblastx) del servidor del NCBI y del servidor del genoma de *Phanerochaete chrysosporium*. Los datos obtenidos que presentaron un valor de e (“*e-value*”) menor a 10^{-5} a partir de estas búsquedas se encuentran resumidos en la Tabla N°4. El valor de e refleja el tamaño de la base de datos y el sistema de puntaje (“*score*”) usado.

A partir de las 500 bandas generadas mediante cDNA-AFLP se aislaron y secuenciaron 34 fragmentos. De estos 9 corresponde a fragmentos que se inducen, 7 se reprimen y 18 con patrones de expresión irregular en las distintas condiciones estudiadas. Luego del estudio de homologías mediante BLAST pudimos identificar al 20 posibles transcritos expresados diferencialmente en respuesta a los cambios en la

TDFs	Homología	Función
C2AB1	Probable Acil-CoA deshidrogenasa mitocondrial	Participa en la oxidación de ácidos grasos
C2AB2	No identificada	---
C2AB3	Similar a proteína de membrana hipotética Schyzophilum commune	Función desconocida, regulada por concentración de nitrógeno
C2AB4	No identificada	---
C2AB5	No identificada	---
C2AF1	Similar a proteína NBD95 de <i>S. cerevisiae</i>	Proteína relacionada a diversas funciones entre ellas biosíntesis de proteínas con centros Fe/S
C2AF2	Probable ER lumen retaining receptor	Proteína de membrana de retículo asociada a destinación de proteínas con señales KDEL
C2AF3	No identificada	---
C2AF5	Probable Acil-CoA sintetasa	Activación de ácidos grasos mediante la unión de Acil-CoA
C2AC1	No identificada	---
C2AC7	Probable FAD-enzyme	Posiblemente asociada a cadena respiratoria
C2AD2	Probable Citocromo oxidasa c1Intron tipo II, dominio RT.	Función desconocida
C2AF6	No identificada	---
C2AG1	Probable Cystathione β-lyase	Metabolismo de aminoácidos (Cisteína y Metionina)
C2AC3	No identificada	---
C2AG4	No identificada	---
C2AG5	Probable Factor de intercambio de nucleótidos de guanina	Metabolismo de nucleótidos
C2AH1	Fenilalanina amonio liasa (PAL)	Metabolismo de aminoácidos (fenilalanina e histidina)
C2AH2	No identificada	---
C2AH3	Probable Acil-CoA sintetasa	Activación de ácidos grasos mediante la unión de Acil-CoA
C2AH4	Probable Acil-CoA deshidrogenasa	Participa en la oxidación de ácidos grasos
C2AI1	Probable peptidasa de membrana (tipo A22B)	Peptidasa de péptido señal
C2AI2	No identificada	---
C2AI3	Probable Acil-CoA deshidrogenasa	Participa en la oxidación de ácidos grasos
C2AE1	Probable factor de transcripción tipo Fets de <i>S. pombe</i>	Factor transcripcional con sitios de unión a ATP/GTP, función desconocida
C2AE3	No identificada	---
C2AE4	No identificada	---
C2AC2	Probable transportador de la familia ABC (P-type).	Familia de proteínas asociadas al transporte de metales
C2AD1	Probable miembro de la familia de transportadores ABC.	Familia de proteínas asociadas al transporte de metales
C2AC2	Dual Specificity Phosphatase (DSP)/MAP quinasa/fosfatasa	Fosfatasa de amplio espectro
C2AK1	Probable mevalonato quinasa	Biosíntesis de colesterol, isoprenoides, fosforilación de aminoácidos
C2AK3	No identificada	---
C2AK4	Proteína Zinc finger del tipo C2H2	Factor transcripcional de función desconocida
C2AE2	No identificada	---

Tabla N°4. Homología y probable función de los TDFs identificados.

Sólo se consideró los resultados con un valor de e menor a 10^{-5} .

En verde claro se muestran los TDFs que aumentaron su expresión al agregar Mn^{2+} , en naranja los que se reprimieron y los amarillos cambiaron su expresión de manera irregular.

concentración de Mn^{2+} en el medio de cultivo. El resto de los fragmentos no presentaron homología frente a las bases de datos utilizadas.

A partir de los resultados derivados mediante el análisis de las secuencias por BLAST en el servidor del genoma de *P. chrysosporium* se obtuvieron las secuencias de posibles proteínas presentes en este organismo, para así intentar obtener más información acerca de la función o datos descritos para proteínas similares en otros organismos que se podrían relacionar con el metabolismo del manganeso en *C. subvermispora*.

Las secuencias proteicas obtenidas fueron analizadas utilizando el servidor TMHMM v2.0 en búsqueda de posibles dominios transmembrana. La predicción de localización subcelular de las posibles proteínas se realizó mediante el análisis en los servidores PSORT v2.0 y ESLpred. Los datos obtenidos luego de estos análisis se encuentran en la Tabla N°5.

Se analizaron secuencias proteicas derivadas del análisis de los fragmentos Cs2AC2 y Cs2AF1, debido a una posible relación directa con el catión Mn^{2+} , por lo que fueron enviadas al servidor SWISS-MODEL para obtener un posible modelo de la estructura derivado de la comparación de nuestra secuencia contra la base de datos de proteínas modeladas de este servidor.

La secuencia derivada del fragmento Cs2AC2 del genoma de *P. chrysosporium* presentó una alta similaridad a otras proteínas de la familia de las P-loop / P-type ATPasas, familia de proteínas de membrana altamente conservadas a lo largo de la

evolución que se pueden encontrar en membranas externas como en membranas internas. El modelo obtenido se muestra en la Figura N°8 (A).

La secuencia obtenida a partir del fragmento Cs2AF1 del genoma de *P. chrysosporium*, entregó como resultado un modelo proteico muy similar a la familia de proteínas Mrp/Nbp35 P-loop NTPasa soluble (Figura N°8, B), descrita previamente en *S. cerevisiae* (Vitale y cols., 1996).

TDF's	Homología	Localización Subcelular	Dominios Transmembrana
Cs2AB1	Probable Acil-CoA deshidrogenasa mitocondrial	Mitocondria	0
Cs2AB3	Similar a proteína de membrana hipotética <i>S. commune</i>	Membrana	1
Cs2AF1	Similar a proteína NBP35 de <i>S. cerevisiae</i>	Citoplasma / Núcleo	0
Cs2AF2	Probable ER lumen retaining receptor	Reticulo Endoplasmático	4
Cs2AF5	Probable Acil-CoA sintetasa	Peroxisoma	7
CsAC7	Probable FAD-enzyme	Mitocondria	0
Cs2AD2	Probable Citocromo oxidasa c/Intron tipo II/ dominio RT.	Citoplasma	0
Cs2AG1	Probable Cystathione β -lyase	Citoplasma	0
Cs2AG5	Probable Factor de intercambio de nucleótidos de guanina	Citoplasma	0
Cs2AH1	Fenilalanina amonio liasa (PAL)	Citoplasma	0
Cs2AH3	Probable Acil-CoA sintetasa	Peroxisoma	6
Cs2AH4	Probable Acil-CoA deshidrogenasa	Citoplasma	0
Cs2AJ1	Probable peptidasa de membrana (tipo A22B)	Reticulo Endoplasmático	5
Cs2AJ3	Probable Acil-CoA deshidrogenasa	Citoplasma	0
Cs2AE1	Probable factor de transcripción tipo Fet5 de <i>S. pombe</i>	Núcleo	0
Cs2AC2	Probable transportador de la familia ABC (P-type).	Reticulo Endoplasmático	8
Cs2AD1	Probable miembro de la familia de transportadores ABC.	Peroxisoma	0
Cs2AG2	Dual Specificity Phosphatase (DSP)/MAP quinasa/fosfatasa	Citoplasma	0
Cs2AK1	Probable mevalonato quinasa	Citoplasma	0
Cs2AK4	Proteína Zinc finger del tipo C2H2	Núcleo	0

Tabla N°5. Homología, localización y dominios transmembrana de los TDFs identificados. En verde claro se muestran los TDFs que aumentaron su expresión al agregar Mn^{2+} , en naranja los que se reprimieron y los amarillos cambiaron su expresión de manera irregular.

(A)



(B)

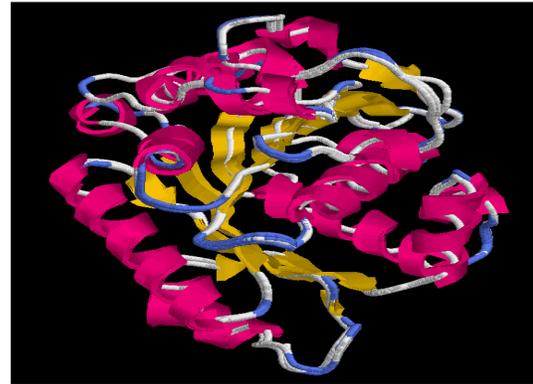


Figura N°8. Modelos obtenidos para los fragmentos Cs2AC2 y Cs2AF1.

(A) Modelo derivado de la secuencia Cs2AC2 similar a un transportador de la familia P-Loop / P-type ATPasa.

(B) Modelo derivado de la secuencia Cs2AF1 similar a la proteína NBP35.

3.5. Validación de datos obtenidos por cDNA-AFLP mediante Northern blot.

Con el fin de validar los resultados obtenidos mediante cDNA-AFLP decidimos realizar el análisis de la expresión génica mediante una técnica de medición directa del nivel de mRNA expresado.

Para esto se utilizó la técnica de Northern blot. En la figura N°9 se muestra el resultado de un Northern blot para una sonda diseñada a partir del fragmento Cs2AF2 y su comparación con un gen constitutivo (GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa), amplificada de plasmidios. Al comparar los datos obtenidos por cDNA-AFLP se ve que existe una correlación con la expresión corroborada mediante Northern blot, pues se observa una tendencia a la activación de este transcrito. En el

gráfico se muestra la relación entre los niveles de Cs2AF2 (posible proteína de retículo) y GAPD luego de la cuantificación mediante el software Scion Image.

Los experimentos de Northern blot para otras secuencias de interés como Cs2AC2 y Cs2AD1 no entregaron resultados satisfactorios, debido a la ausencia de bandas detectadas, probablemente debido a la baja cantidad de estos transcritos. Sin embargo anteriormente estos transcritos fueron amplificados a partir de ADNc mediante RT-PCR.

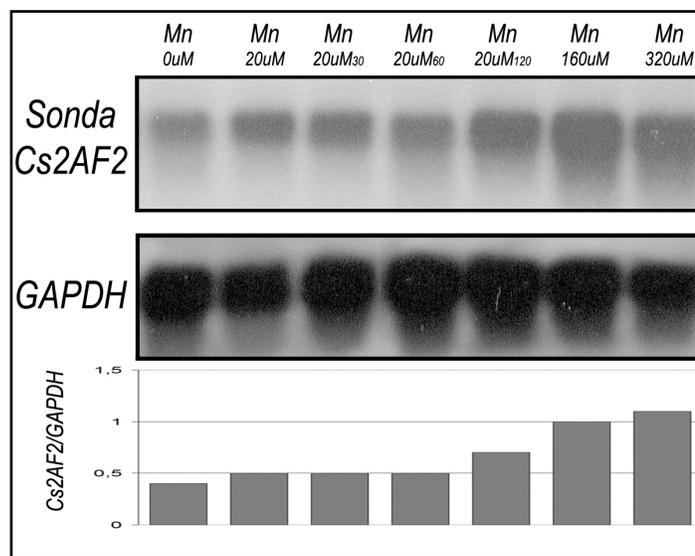


Figura N°9. Northern blot para la sonda Cs2AF2.

En cada carril se cargaron cantidades equivalentes de ARN total de cada muestra (10 μg)

Se puede apreciar que existe una inducción del transcrito al comparar los resultados de las condiciones con 0 μM y 160 μM de Mn²⁺. Al observar en el gráfico la relación de cada banda con GAPDH, datos que corroboran lo observado para este fragmento en el experimento de cDNA-AFLP.

4. DISCUSIÓN

4.1. Análisis de la expresión génica de *C. subvermispora* mediante la técnica de cDNA-AFLP.

El objetivo de esta tesis fue desarrollar un método basado en la técnica de cDNA-AFLP para el estudio de la expresión diferencial de genes en *C. subvermispora* en respuesta a cambios en la concentración de Mn^{2+} .

La técnica de cDNA-AFLP ha sido ampliamente usada en los últimos años para el análisis de la expresión génica, principalmente en plantas y organismos de alta complejidad, en los cuales se hace muy costoso generar la información genómica necesaria para llevar a cabo otras metodologías más poderosas como la de microarreglos de ADN.

El hongo basidiomicete *C. subvermispora* ha sido estudiado por nuestro grupo con el fin de comprender la compleja maquinaria ligninolítica que presenta, formada por MnP, lacasas y otras enzimas. La complejidad de este reto ha ido en aumento por lo que se ha hecho necesario, al igual que en gran parte de la investigaciones biológicas, una estrategia distinta en la forma de enfrentar los problemas tratando de comprender mediante una visión más general los cambios a nivel de transcriptoma en respuesta a un estímulo en los organismos de interés.

El manganeso es un metal indispensable para la vida de la mayor parte de los organismos. Este también es el caso de *C. subvermispora*, en el cual la falta de este nutriente retrasa notoriamente el crecimiento en cultivos en medio líquido en comparación a condiciones estándar de cultivo (0,16 mM de Mn^{2+}). Así como las bajas

concentraciones de manganeso alteran la sobrevivencia de *C. subvermispora*, hemos visto que concentraciones superiores de Mn^{2+} en los medios de cultivo también disminuyen el crecimiento y actividad de MnP en el medio extracelular. Este efecto tóxico del manganeso ha sido estudiado en diversos organismos donde se ha reportado que altas concentraciones de manganeso intracelulares pueden interferir con sitios de unión del ión Mg^{2+} (Cho y cols., 2005).

Por estas razones hemos diseñado un experimento de cDNA-AFLP con el cual pudimos comparar la expresión génica en diferentes concentraciones de manganeso y así poder comprender en forma global más acerca de las vías de respuesta metabólica frente a este metal.

Para simplificar el montaje de la técnica en su etapa de selección de parejas de partidores a utilizar, elegimos los cultivos crecidos en presencia de 0 mM y 0,16 mM de Mn^{2+} . Mediante el análisis de los productos de PCR obtenidos en la etapa de amplificación selectiva para dichas condiciones se llegó a definir que 10 parejas de partidores entregaron el número de bandas necesario para llevar a cabo el estudio de un total de 256 combinaciones. Una de las ventajas de la técnica de cDNA-AFLP es que estas parejas de partidores podrán ser utilizadas en el futuro en cualquier otro experimento que se desee realizar en *C. subvermispora*, haciendo el análisis por cDNA-AFLP mucho más sencillo, rápido y barato.

Luego de la selección de parejas se llevó a cabo el análisis de todas las condiciones antes mencionadas, identificándose así 20 posibles genes que responden de diversa manera a los cambios de Mn^{2+} en el medio de crecimiento.

4.2. Análisis de secuencias obtenidas a partir de cDNA-AFLP.

Los fragmentos generados por cDNA-AFLP son de tamaños entre 100 y 700 pares de bases, por lo que para llevar a cabo un análisis más exhaustivo de la posible estructura y función de las proteínas correspondientes a los TDFs encontrados se necesitó acudir a las bases de datos del proyecto del genoma de *P. chrysosporium*. Este es un hongo de pudrición blanca, semejante al utilizado por nuestro grupo, con el fin de identificar de una manera aproximada los transcritos y determinar a qué gen corresponden, para luego proceder a su análisis y determinar cuál es su rol en la homeostasis del manganeso. Aunque lo ideal hubiese sido trabajar con las secuencias obtenidas directamente de *C. subvermispora*, ésto fue imposible dado que ninguno de los fragmentos aislados en este estudio había sido secuenciado previamente en este organismo. Hasta el día de hoy sólo se han reportado 10 secuencias completas de genes para este organismo en GenBank. Esta situación demuestra la capacidad de la técnica elegida para realizar un análisis amplio de la expresión génica de un organismo del cual se desconoce la mayor parte del genoma.

4.3. Relación entre fragmentos identificados y Manganeso.

De los 20 fragmentos que presentaron homología con las bases de datos, 2 presentaron similitud con proteínas que se ha descrito tendrían relación directa con el ión Mn^{2+} . El fragmento Cs2AC2 es en nuestra opinión el más interesante de éstos, pues probablemente corresponde a un fragmento derivado de un transcrito para un transportador tipo ABC. Según los análisis *in silico* realizados, este transcrito codificaría para una proteína integral de membrana con alrededor de 8 dominios de transmembrana.

En la literatura se ha reportado que es probable que la mayor parte de la regulación de la homeostasis de Mn^{2+} sea llevada a cabo por transportadores de cationes bivalentes que transportan principalmente Ca^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{2+} (Cullota y cols., 2005). Es muy interesante el grado de similitud que presenta este putativo transportador con otras proteínas transportadoras como son PMR1, una ATPasa de calcio tipo P capaz de regular la homeostasis de calcio y manganeso en el aparato de Golgi (Cho y cols., 2005), al igual que una proteína humana de la misma familia previamente cristalizada cuya estructura se muestra en la Figura N°8 (Toyoshima y cols., 2000).

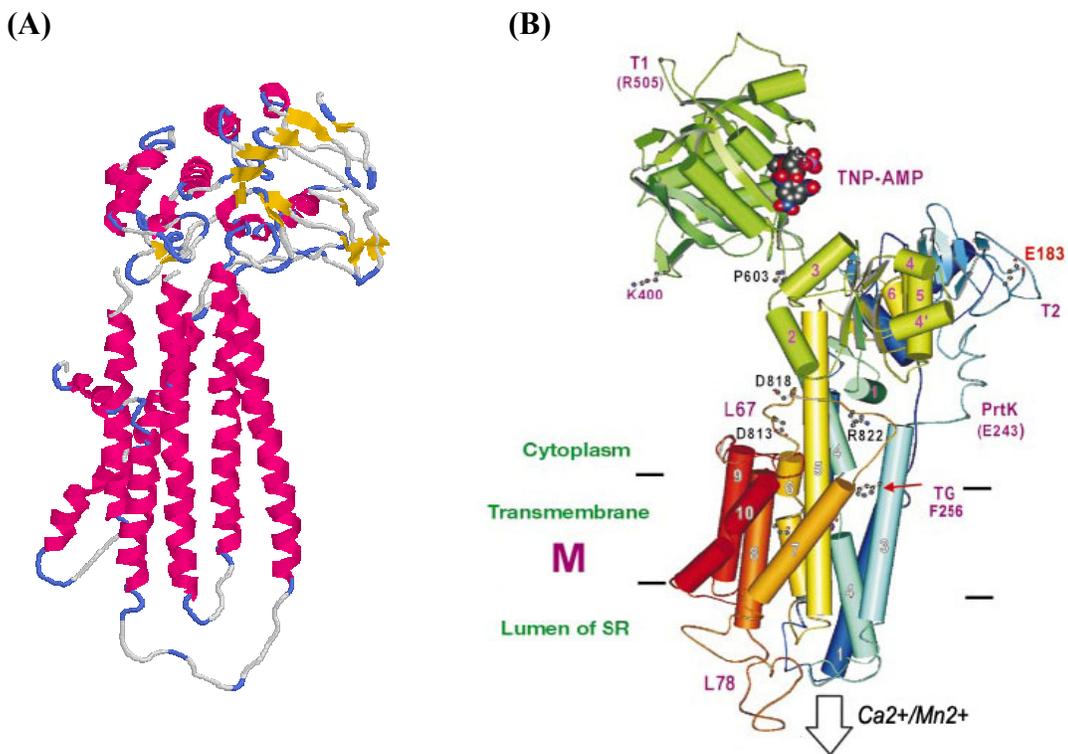


Figura N°10. Modelos de proteínas transportadoras de la familia de ATPasa tipo P.

- (A) Modelo obtenido por modelamiento comparativo de la secuencia derivada del fragmento Cs2AC2.
- (B) Esquema de la estructura obtenida por Toyoshima y cols. en el año 2000, para una bomba de calcio del tipo P-type ATPasa de retículo sarcoplásmico de células musculares.

La proteína PMR1 descrita en *S. cerevisiae* se propone como la principal ruta de destoxificación cuando la célula se encuentra en situaciones de alto Mn^{2+} (Cho y cols., 2005). A diferencia de lo descrito para este organismo, el posible transcrito encontrado en este trabajo presenta una expresión reprimida al agregar Mn^{2+} . Es importante recalcar que no siempre el aumento de la expresión de un gen está acompañado por un alza de las cantidades de proteína producidas en la célula debido a diversos mecanismos de regulación post-transcripcionales. Otra hipótesis es que las condiciones de nuestro experimento hayan estado lejos de ser tóxicas para *C. subvermispora*, es decir que Mn^{2+} 320 μM no haya sido suficiente para aumentar la expresión de este gen similar a PMR1, y sólo hayamos visto la expresión de este como respuesta a las bajas concentraciones de Mn^{2+} . Se sabe que la presencia de este ión es fundamental para el correcto plegamiento y glicosilación de proteínas en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Dürr y cols., 1998). El fragmento Cs2AF2 podría relacionarse a este fenómeno, dado que es similar a proteínas de retículo las que podrían ser reprimidas en situaciones de falta de Mn^{2+} o Ca^{2+} . Como se dijo anteriormente, ambas especies catiónicas son fundamentales para mantener el estado oxidante del retículo, que es primordial para la correcta formación de puentes disulfuro y para el plegamiento de proteínas en general. Si este proceso no se lleva a cabo eficientemente puede desencadenar respuestas como la respuesta a proteínas no plegadas en este organelo (Bernalles y cols., 2006; Görlach y cols., 2006).

Otro fragmento con un patrón similar fue el fragmento Cs2AD1, el que podría corresponder a otra proteína de la familia de transportadores ABC, pero a diferencia de Cs2AC2 no tendría dominios transmembrana y su localización sería peroxisomal, lo cual no ha sido reportado, por lo que es difícil explicar su posible función.

Ambos fragmentos, Cs2AC2 y Cs2AD1, reafirmarían la hipótesis que existiría una red de tráfico de manganeso, ya que su función se concentraría principalmente en algunos organelos que requieren de éste para llevar a cabo sus funciones.

La carencia de manganeso podría tener diversos efectos en la célula: En primer lugar se podría inferir que llevaría a una falla en la funcionalidad de diversas enzimas que utilizan este catión como cofactor. Una de las enzimas más importantes de este tipo en la célula sin duda es la superóxido dismutasa dependiente de Mn^{2+} (MnSOD), presente en la matriz mitocondrial de la mayor parte de las células eucarióticas, la que se considera una enzima muy importante en la defensa celular frente al estrés oxidativo (Freálle y cols., 2006). En segundo lugar, se sabe que el Mn^{2+} funciona como cofactor de múltiples enzimas relacionadas con la defensa frente a estrés oxidativo, tales como catalasas y peroxidasas, además de ser un atrapador de radicales por sí sólo (Cho y cols., 2005; Luk y cols., 2001). Aunque no pudimos identificar algún fragmento derivado directamente de proteínas de respuesta a este tipo de estrés, algunos fragmentos nos podrían dar cuenta de este fenómeno: Uno de estos fragmentos es el Cs2AF1, el cual derivaría de un transcrito similar a la proteína NBP35 descrita en *S. cerevisiae*, la cual participaría en el proceso de biosíntesis de proteínas con centros hierro-azufre (Fe/S), proceso que se ve muy afectado por el estado redox de la célula (Hausmann y cols.,

2005; Lill y Mühlenhoff, 2006). El patrón de expresión de este fragmento sugiere una posible detención en la síntesis de algunas proteínas fundamentales inducida por el aumento de especies reactivas de oxígeno (EROs), efecto que se revertiría al suplementar nuevamente el medio con Mn^{2+} . Este efecto oxidante debido a la falta de manganeso en el medio podría explicar el crecimiento tan pobre presente en los cultivos con 0 μM de Mn^{2+} utilizados.

Los estudios realizados por nuestro grupo en búsqueda del efecto de EROs sobre *C. subvermispora* han sido infructuosos debido a la complejidad del sistema a estudiar. Este hongo normalmente habita en un medio altamente oxidante, debido a que el proceso de degradación de lignina requiere una gran cantidad de especies radicalarias que puedan difundir y así degradar la compleja estructura amorfa de este biopolímero, por lo que es incierto el efecto del estrés oxidativo sobre la supervivencia de este organismo. Más complejo aún ha sido tratar de cuantificar las especies como radical superóxido, peróxido y EROs en general, dado que para la medición de la mayoría de estos radicales se utilizan compuestos aromáticos, que también son sensibles al ataque de las enzimas ligninolíticas.

La mayor parte de los fragmentos identificados corresponde a posibles proteínas que participan en el metabolismo general, especialmente de lípidos y metabolismo aminoacídico, así como también en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial y maquinaria traduccional. Los efectos que se pueden apreciar son diversos, pero en general al restaurar las condiciones estándar de crecimiento se revierten los efectos observados.

Muchos de los fragmentos, como Cs2AK4 y Cs2AE2 que posiblemente codifican para algún factor transcripcional, son difíciles de asociar a una función debido a lo pequeño de los fragmentos y a que se asemejan sólo en parte a dominios o trozos pequeños de proteínas que en su mayoría son hipotéticas o simplemente de función desconocida. En estos casos es necesario seguir su estudio probablemente buscando genes completos o promotores que nos hablen de su función con mayor certeza.

4.4. Corroboración de datos de cDNA-AFLP por Northern Blot.

Los datos obtenidos de este tipo de técnicas de análisis masivo de la expresión génica siempre deben ser corroborados mediante experimentos basados en el análisis directo de ARN, ya sea mediante Northern blot o RT-PCR.

Nuestro objetivo fue realizar esta corroboración mediante Northern blot, técnica que presenta principalmente ventajas de confiabilidad frente al RT-PCR semicuantitativo, las cuales son indispensables para llevar a cabo la validación necesaria. Fue posible estandarizar de manera efectiva este método para el análisis del fragmento Cs2AF2 del cual se logró corroborar su patrón de expresión. Los otros fragmentos para los que se generaron sondas fueron imposibles de analizar, ya que en las hibridaciones entregaban bandas escasamente visibles, resultado que no pudo ser mejorado ni al aumentar la cantidad de muestra, sonda o tiempo de exposición.

Esta etapa del análisis por cDNA-AFLP es fundamental por lo que en el futuro se debe realizar esta comprobación, aunque puede ser recomendable el uso de otra técnica que permita un análisis más sensible, como por ejemplo una técnica basada en PCR,

dado que el problema puede haber sido generado debido a una baja cantidad presente de aquellos transcritos analizados en el cultivo inicial.

5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

- Se logró montar la técnica de cDNA-AFLP para *C. subvermispora*. Luego del análisis preliminar, se eligieron 10 parejas de partidores que cumplen con las condiciones necesarias para realizar un estudio por cDNA-AFLP. Estas parejas de partidores servirán para cualquier otro estudio con esta técnica que se quiera llevar a cabo en *C. subvermispora*.
- Luego de analizar los patrones generados por las 10 parejas de partidores para las 7 condiciones de diferente concentración de manganeso, se identificaron 34 fragmentos derivados de transcritos que se expresaban diferencialmente. De ellos, 20 transcritos presentaron homología con proteínas conocidas o hipotéticas de las bases de datos del NCBI y del proyecto genoma de *P. chysosporium*.
- Se identificaron 2 posibles proteínas que tendrían relación directa con el metabolismo del manganeso, probablemente mediante su unión o transporte dentro de la célula, participando así en su homeostasis. Ambos fragmentos fueron aislados en las condiciones con mínima concentración de Mn^{2+} , lo cual sugiere que probablemente están relacionados con la captación y distribución de este catión en condiciones de escasez o carencia de manganeso.

- Los niveles mínimos de manganeso utilizados en este trabajo afectan seriamente el crecimiento y supervivencia del hongo, probablemente por la pérdida de la funcionalidad de su maquinaria antioxidante (MnSOD, peroxidasas, catalasas, etc.).
- Se hace necesario estudiar más en profundidad los posibles genes identificados, es decir determinar su secuencia completa y caracterizarlos, para así comprender a cabalidad su relación con el metabolismo del manganeso.
- Con el fin de corroborar los datos aquí obtenidos, se realizó Northern blot para 3 sondas diseñadas a partir de los fragmentos aislados. Se logró detectar la sonda Cs2AF2 correspondiente a una proteína de retículo, probablemente relacionada a funciones de destinación de proteínas. Se corroboró que es inducida al aumentar la cantidad de Mn^{2+} en el medio. No fue posible detectar los otros dos fragmentos estudiados por esta técnica.
- Para la validación de los patrones de expresión de los fragmentos que no se pudieron detectar mediante northern blot, se propone utilizar RT-PCR en tiempo real.

6. REFERENCIAS

- Bachem CWB**, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M y cols. (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* 9(5): 745-753.
- Bachem CW**, Oomen R, Visser R (1998) Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. *Plant Molec Biol Rep* 16(2): 157-157.
- Banerjee N**, Zhang MQ (2002) Functional genomics as applied to mapping transcription regulatory networks. *Curr Opin Microbiol* 5(3): 313-317.
- Bauer D**, Warthoe P, Rohde M, Strauss M (1994) Detection and differential display of expressed genes by DDRT-PCR. *PCR Methods Appl* 4(2): S97-108.
- Bellini P**, Hemmings AM (2006) *In vitro* characterization of a bacterial manganese uptake regulator of the fur superfamily. *Biochemistry* 45(8): 2686-2698.
- Bernales S**, Papa FR, Walter P (2006) Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 487-508.
- Bonnarme P**, Jeffries TW (1990) Mn(II) Regulation of Lignin Peroxidases and Manganese-Dependent Peroxidases from Lignin-Degrading White Rot Fungi. *Appl Environ Microbiol* 56(1): 210-217.
- Brown JA**, Alic M, Gold MH (1991) Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: activation by manganese. *J Bacteriol* 173(13): 4101-4106.
- Cho JH**, Ko KM, Singaravelu G, Ahnn J (2005) *Caenorhabditis elegans* PMR1, a P-type calcium ATPase, is important for calcium/manganese homeostasis and oxidative stress response. *FEBS Lett* 579(3): 778-782.
- Cohen R**, Persky L, Hazan-Eitan Z, Yarden O, Hadar Y (2002) Mn²⁺ alters peroxidase profiles and lignin degradation by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* under different nutritional and growth conditions. *Appl Biochem Biotechnol* 102-103(1-6): 415-429.
- Culotta VC**, Yang M, Hall MD (2005) Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4(7): 1159-1165.

Diaz-Mireles E, Wexler M, Sawers G, Bellini D, Todd JD y cols. (2004) The Fur-like protein Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a Mn(2+)-responsive transcriptional regulator. *Microbiology* 150(Pt 5): 1447-1456.

Diaz-Mireles E, Wexler M, Todd JD, Bellini D, Johnston AW y cols. (2005) The manganese-responsive repressor Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a member of the Fur-superfamily that recognizes an unusual operator sequence. *Microbiology* 151(Pt 12): 4071-4078.

Donson J, Fang Y, Espiritu-Santo G, Xing W, Salazar A y cols. (2002) Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol Biol* 48(1-2): 75-97.

Dürr G, Strayle J, Plemper R, Elbs S, Klee SK y cols. (1998) The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Biol Cell* 9(5): 1149-1162.

Eggert C, Temp U, Eriksson KEL (1997) Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Letters* 407(1): 89-92.

Eriksson KE, Blanchette RA, Ander P (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin ; New York: Springer-Verlag. ix, 407 p. p.

Frealle E, Noel C, Nolard N, Symoens F, Felipe MS y cols. (2006) Manganese superoxide dismutase based phylogeny of pathogenic fungi. *Mol Phylogenet Evol* 41(1): 28-39.

Görlach A, Klappa P, Kietzmann DT (2006) The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal* 8(9-10): 1391-1418.

Hausmann A, Aguilar Netz DJ, Balk J, Pierik AJ, Muhlenhoff U y cols. (2005) The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(9): 3266-3271.

Ikeda JS, Janakiraman A, Kehres DG, Maguire ME, Slauch JM (2005) Transcriptional regulation of sitABCD of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by MntR and Fur. *J Bacteriol* 187(3): 912-922.

Jakubovics NS, Jenkinson HF (2001) Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria. *Microbiology* 147(Pt 7): 1709-1718.

Johansson T, Nyman PO, Cullen D (2002) Differential regulation of *mnp2*, a new manganese peroxidase-encoding gene from the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* PRL 572. *Appl Environ Microbiol* 68(4): 2077-2080.

Kuhn E (2001) From Library Screening to Microarray Technology: Strategies to Determine Gene Expression Profiles and to Identify Differentially Regulated Genes in Plants. *Ann Bot* 87(2): 139-155.

Lill R, Muhlenhoff U (2006) Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 457-486.

Lobos S, Larraín J, Salas L, Cullen D, Vicuña R (1994) Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. *Microbiology* 140 (Pt 10): 2691-2698.

Lobos S, Larrondo L, Salas L, Karahanian E, Vicuña R (1998) Cloning and molecular analysis of a cDNA and the *Cs-mnp1* gene encoding a manganese peroxidase isoenzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. *Gene* 206(2): 185-193.

Luk EE, Culotta VC (2001) Manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* acquires its metal co-factor through a pathway involving the Nramp metal transporter, Smf2p. *J Biol Chem* 276(50): 47556-47562.

Ma B, Mayfield MB, Godfrey BJ, Gold MH (2004) Novel promoter sequence required for manganese regulation of manganese peroxidase isozyme 1 gene expression in *Phanerochaete chrysosporium*. *Eukaryot Cell* 3(3): 579-588.

Manubens A, Avila M, Canessa P, Vicuña R (2003) Differential regulation of genes encoding manganese peroxidase (MnP) in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. *Curr Genet* 43(6): 433-438.

Otjen L, United States. Forest Service. (1987) Assessment of 30 white rot basidiomycetes for selective lignin degradation. Washington, D.C.: Forest Service. p. 343-349 p.

Perie FH, Gold MH (1991) Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl Environ Microbiol* 57(8): 2240-2245.

Pittman JK (2005) Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol* 167(3): 733-742.

- Reijans M**, Lascaris R, Groeneger AO, Wittenberg A, Wesselink E y cols. (2003) Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and genechip expression data in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics* 82(6): 606-618.
- Rüttimann C**, Schwember E, Salas L, Cullen D, Vicuña R (1992) Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnol Appl Biochem* 16: 64-76.
- Salas C**, Lobos S, Larrain J, Salas L, Cullen D y cols. (1995) Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnol Appl Biochem* 21 (Pt 3): 323-333.
- Tello M**, Corsini G, Larrondo LF, Salas L, Lobos S y cols. (2000) Characterization of three new manganese peroxidase genes from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochim Biophys Acta* 1490(1-2): 137-144.
- Tello M**, Seelenfreund D, Lobos S, Gaskell J, Cullen D y cols. (2001) Isolation and characterization of homokaryotic strains from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *FEMS Microbiol Lett* 199(1): 91-96.
- Thiele DJ** (1992) Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 20(6): 1183-1191.
- Toyoshima C**, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405(6787): 647-655.
- Van Ho A**, Ward DM, Kaplan J (2002) Transition metal transport in yeast. *Annu Rev Microbiol* 56: 237-261.
- Vitale G**, Fabre E, Hurt EC (1996) NBP35 encodes an essential and evolutionary conserved protein in *Saccharomyces cerevisiae* with homology to a superfamily of bacterial ATPases. *Gene* 178(1-2): 97-106.