

Comparación de fragmentos de genes que codifican para proteínas ribosomales de caña de azúcar

María I. Oloriz¹, Luis Rojas¹, Víctor Gil², Aminael Sánchez¹, Elio Jiménez¹ y Orelvis Portal¹. *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: maria@ibp.co.cu

² Centro de Investigaciones Agropecuarias Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830

RESUMEN

Secuencias parciales de genes de caña de azúcar obtenidos como resultado de una biblioteca sustractiva, fueron comparadas con las existentes en bases de datos, mediante el algoritmo BLAST. Durante la búsqueda de homología se identificaron cinco genes que codifican para proteínas ribosomales, tanto de cloroplastos como citoplasmáticas. La mayor homología obtenida entre las secuencias identificadas como genes codificantes de proteínas ribosomales de caña de azúcar fue con el genoma de maíz.

Palabras clave: biblioteca sustractiva, dominios consensus, *Saccharum* spp.

ABSTRACT

Partial sequences of sugarcane genes, obtained by means of a subtractive library were identified by BLAST alignment against all sequences available in the databases. During the homology search, five genes were identified as chloroplast or cytosol ribosomal proteins. The biggest homology obtained among the identified sequences as ribosomal proteins of sugarcane was with the corn genome.

Key words: consensus domain, *Saccharum* spp., subtractive library

INTRODUCCIÓN

El ribosoma de células eucariotas es una estructura compleja compuesta por cuatro moléculas de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) y aproximadamente 80 proteínas ribosomales (proteínas-r). Este representa una pieza clave en la maquinaria celular, responsable de la síntesis de proteínas, desempeña un importante papel en el control del crecimiento, división y desarrollo celular (Reski *et al.*, 1998). Defectos genéticos en los componentes del ribosoma, como la reducción de los niveles individuales de proteínas-r, pueden causar efectos deletéreos en el desarrollo y fisiología de un organismo. En *Drosophila melanogaster*, las mutaciones en los genes de las proteínas-r causan el fenotipo diminuto haplo-insuficiente con bajo crecimiento y tasa de división celular, caracterizado por un tamaño del cuerpo reducido (Lambertsson, 1998). En contraste, una mutación condicional en el gen que codifica la proteína-r S6 en ratones adultos afecta la progresión del ciclo celular pero no el crecimiento celular (Volarevic *et al.*, 2000). En humanos, alteraciones a nivel de la proteína-r S4 conduce a la aparición de individuos con fenotipos complejos donde es frecuente estatura baja e infertilidad (Zinn y Ross, 1998).

En plantas, las mutaciones en los genes de las proteínas-r afectan la viabilidad del embrión o desarrollo de la planta (Ito *et al.*, 2000). Además, se

ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de transcritos de estas proteínas y la división celular en estudios realizados en suspensiones celulares (Garo *et al.*, 1994), hipocotilos tratados con auxinas, meristemos apicales, hojas jóvenes y raíces laterales (Gantt y Codifica, 1985; Williams y Sussex, 1995).

El conocimiento de los elementos que componen los ribosomas de varios organismos, ha permitido establecer las relaciones evolutivas en la célula eucariota. Se plantea que los ribosomas de un antepasado de archaeobacteria dieron lugar a ribosomas del citosol (Wittmann-Liebold *et al.*, 1990). Los ribosomas de plastidios y mitocondria guardan una estrecha relación evolutiva con los de eubacterias (Yamaguchi *et al.*, 2000).

Barakat *et al.* (2001) realizaron un análisis detallado de los genes ribosomales del genoma de *Arabidopsis thaliana* y confirmaron que los genes para esta familia se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma y poseen una extensa duplicación, existiendo pérdidas o inserciones de fragmentos dentro de estos. Encontraron 32 proteínas ribosomales de la subunidad pequeña codificadas por 101 genes y 48 proteínas ribosomales de la subunidad grande codificadas por 148 genes y que la expresión de la mayoría de los genes de esta familia ocurre de modo diferencial.

Además del papel que desarrollan las proteínas-r en la síntesis de proteínas se ha demostrado funciones extra-ribosomales (Wool, 1996) para miembros de esta familia. Pocos estudios existen sobre la regulación de la expresión de estas proteínas, sin embargo se demostró la inducción de la proteína-r S26 en respuesta a radiaciones ultravioletas tipo B en guisantes (Brosche y Strid, 1999). En soya la expresión de la proteína-r L2 es inducida en respuesta a la infección por patógenos (Ludwig y Tenhaken, 2001). Teixeira-Gomes *et al.* (2000) demostraron la expresión diferencial de la proteína-r S1 en respuesta a estrés por calor, oxidativo y por ácido en plantas de *Brucella melitensis*. También Liu y Baird (2003) observaron la expresión de la proteína-r S28 de *Helianthus annuus* en respuesta a sequía, alta salinidad y al ácido abscísico.

Para aislar los genes expresados diferencialmente durante la interacción no compatible de *Puccinia melanocephala*-caña de azúcar, fue confeccionada una biblioteca sustractiva que cuenta con 368 fragmentos de genes. El 40 % de los cuales fueron secuenciados y comparados en bases de datos. El presente trabajo tuvo como objetivo comparar cinco secuencias parciales de los genes que codifican para proteínas ribosomales de la biblioteca sustractiva, mediante el algoritmo BLAST que facilite un posterior estudio de expresión de estas proteínas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Confección de la biblioteca sustractiva

Se construyó una biblioteca sustractiva a partir de secuencias aisladas en un proceso de hibridación sustractiva por supresión de los ácidos desoxinucleicos copias (ADNc) de caña de azúcar cultivar IBP 8518 (Oloriz *et al.*, 2002). Se siguieron las instrucciones del sistema comercial *PCR-Select cDNA Subtraction* (Clontech K1804-1).

Los productos obtenidos de la sustracción fueron clonados en el vector *pGEM-T Easy Vector* (Promega A1360).

Comparación de secuencias

Se seleccionaron un total de 147 fragmentos de genes de la biblioteca sustractiva para la secuenciación, bajo el criterio de su diferenciación de acuerdo con su longitud en pares de bases (pb).

Las secuencias de nucleótidos fueron comparadas con la base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el algoritmo BLAST, empleando la matriz BLOSUM62. Se consideró como índice de homología significativo en la alineación de la cadena de bases nitrogenadas (BLASTN) o el polipéptido (BLASTX) los valores de E menores que 0.0001 y un valor mayor que 80 para similitud (PAM 120), (Newman *et al.*,

1994). También se realizó la búsqueda de dominios consenso mediante la herramienta RPS-BLAST.

Mediante este proceder se le asignaron posibles funciones biológicas a secuencias aisladas en la biblioteca sustractiva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran los resultados de la comparación mediante BLASTN y BLASTX de cinco fragmentos de genes obtenidos en la hibridación sustractiva, los que fueron identificados como genes que codifican para proteínas ribosomales. El menor valor E resultante de este algoritmo para cada una de las cinco secuencias analizadas se correspondió con genes que codifican para proteínas ribosomales, tanto de cloroplasto como de citoplasma. En estos casos los valores de E para el BLASTN fueron siempre inferiores a $9e^{-82}$, lo cual es una evidencia de la alta homología alcanzada durante la comparación de secuencias. El empleo del RPS-BLAST confirmó los resultados obtenidos al encontrar los dominios consensos correspondientes de cuatro de las cinco secuencias analizadas. Para la secuencia número 5 no fue detectado un dominio definido, posiblemente por ser un fragmento pequeño, 212 pb que no coincide con la región más conservada de la proteína (Figura 1).

Para esta gran familia de proteínas, la mayor homología encontrada resultó ser con secuencias de maíz (*Zea mays*), excepto para la secuencia número cuatro, donde sí se encontró un gen homólogo de caña de azúcar. Esto se debe a la poca contribución del género *Saccharum* en las bases de datos públicas para secuencias de nucleótidos y proteínas.

Es de señalar que para el caso de las secuencias de caña de azúcar identificadas como proteínas-r del citoplasma presentaron valores de E inferiores a los obtenidos para aquella secuencia identificada como proteínas-r de cloroplasto. Aparentemente este resultado entra en contradicción con resultados obtenidos previamente por Yamaguchi *et al.* (2003) que trabajando con *Chlamydomonas reinhardtii*, un alga verde unicelular, encontraron que las proteínas ribosomales codificadas por genes de cloroplasto son más conservadas entre diferentes organismos que aquellas proteínas ribosomales codificadas por el núcleo (las citoplasmáticas). Esta contradicción puede ser explicada por el hecho que el presente trabajo compara secuencias de dos especies dentro de una familia (la *Poaceae*).

Durante mucho tiempo se consideró que todos los genes que codifican para proteínas ribosomales tienen expresión constitutiva, sin embargo otros trabajos de hibridación sustractiva por supresión han demostrado que muchos de estos genes son expresados diferencialmente por la planta bajo condiciones de estrés, tanto biótico como abiótico. Ejemplos de lo

anteriormente planteado son las experiencias de Luo *et al.* (2002) cuando aislaron los genes expresados en plantas de trigo inoculadas con *Erysiphe graminis*. Por su parte Sáez-Vásquez *et al.* (2000) demostraron patrones alterados de proteínas de la biogénesis, en plantas de caña de azúcar expuestas a bajas temperaturas, a través de la inducción de la proteína similar a la ribosomal 60S L13 y Watt (2003) encontró dos secuencias correspondientes a proteínas ribosomales de la 60S cuando aisló los genes que se expresaban diferencialmente en plantas de caña de azúcar sometidas a concentraciones fitotóxicas de aluminio.

Las condiciones en las que fueron aisladas las secuencias de este trabajo, hacen suponer que se trata de genes regulados diferencialmente durante la interacción incompatible de *P. melanocephala* con

el cultivar IBP 5818, estos resultados deben complementarse con ensayos de expresión diferencial (RT-PCR o *Northern Blot*) para comprobar la inducción individual de cada una de las secuencias aisladas.

No obstante, la caracterización de cinco secuencias que codifican para proteínas ribosomales de caña de azúcar permite un acercamiento al conocimiento del polisoma de esta especie y confirma, una vez más, la sintenia existente con el genoma de maíz que puede ser aprovechada en otros estudios, aplicando herramientas bioinformáticas.

La secuencia de nucleótidos correspondiente a cuatro de las secuencias analizadas en este trabajo se encuentran disponibles en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> con números de acceso DQ363991, AY796052 DQ363992 y DQ363993.

Tabla 1. Resultados de la comparación, mediante el algoritmo BLAST, de cinco secuencias de caña de azúcar identificadas como genes que codifican para proteínas ribosomales.

No.	Longitud (pb)	Secuencia con homología en bases de datos	Valor E* BLASTN	Valor E* BLASTX	No. de Acceso
1	321	Proteína-r L31 de cloroplasto	1e ⁻⁸²	4e ⁻³¹	AY1100540
2	503	Proteína-r L36 citoplasmática	4e ⁻¹⁷¹	1e ⁻⁴⁹	AY103812
3	527	Proteína-r L18 citoplasmática	5e ⁻¹⁶⁷	1e ⁻⁵³	BT017364
4	396	Proteína-r S27 citoplasmática	e ⁻¹⁸⁰	4e ⁻⁷⁶	<i>Saccharum</i> sp. AY781904
			e ⁻¹²⁸	3e ⁻³²	AY104498
5	212	Proteína-r L1, citoplasmática	4e ⁻⁸⁸	2e ⁻²²	BT016602

* Menor valor de significación E obtenido como resultado del alineamiento de secuencias por el algoritmo BLASTN o BLASTX.

Query: 1 TVDIWSGNHPYYVGDTSALIVMDSQIEKFRKKWG 34

Sbjct: 34 NVD/CSKCHPFTYTG-SQKI/DTEGRVIERFMKKYN 66

Secuencia 1 Dominio Ribosomal L31 valor de E= 3e⁻⁰⁴

Query: 8 KSGLFVG/NKGHVVTKRELPPRPSHRKKGKATKRVSMVRGL/REVAGFAPYEKR/TELLKV 67

Sbjct: 3 KYGLAVGLNKGHKTKLPV/APRISRKGAASNRTKVFVRSI/REVAGLAPYERR/IELLRN 62

Query: 68 GKDKRALKVAKRKLGLTHKRAKKREEMAGVLKMRSA 104

Sbjct: 63 SKDKRALKFLKRLGLTHIRAKRREELSNVIAASRKA 99

Secuencia 2 Dominio Ribosomal L36e, valor de E= 3e⁻²⁶

Query: 1 GTVTDDKRIQEVPAMKVLTALRFTETARARI/NAGGECLTFDQLALRAPLGENTVLLRGPK 60

Sbjct: 75 GTVTDDVRIHE/PKLKVCALRFTKRARARILKAGGECLTFDQLALRAPLQNTVLLRGPR 134

Query: 61 NAREAVRHFGKAPGVPHSHTKPYVRSKGRKFEKARGRRNSRGFK 104

Sbjct: 135 NAREAVRHFG--NGVPHSHTKPYVRSKGRKFERARGRRNSRGFK 176

Secuencia 3 Dominio Ribosomal L18e valor de E= 1e⁻³⁷

Query: 8 PNSFFMDVKCQGCFSITTVFHSQTVVVCPCGQTVLCOPTGGKARLTEGCSFRRK 62

Sbjct: 1 PNSYFLDVKCPGCGMITTVFSHAQTVVKCIICGKVLCEPTGGKGLKAGISFRRK 55

Secuencia 4 Dominio Ribosomal S27 valor de E = 1e⁻¹⁹

Figura 1. Dominios consensos encontrados en tres de las secuencias que codifican para proteínas ribosomales como resultado del empleo del algoritmo RPS-BLAST. Se destacan en negrita los aminoácidos iguales y en itálica los aminoácidos isofuncionales.

REFERENCIAS

- Barakat, A, Szick-Miranda, K, Chang, I, Guyot, R, Blanc, G, Cooke, R, Delseny, M, Bailey-Serres, J (2001) The Organization of Cytoplasmic Ribosomal Protein Genes in the Arabidopsis Genome. *Plant Physiology* 127: 398-415
- Brosche, M, Strid, A (1999). The mRNA-binding ribosomal protein S26 as a molecular marker in plants: molecular cloning, sequencing and differential gene expression during environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1445: 342-344
- Gantt, JS, Key, JL (1985) Coordinate expression of ribosomal protein mRNAs following auxin treatment of soybean hypocotyls. *J. Biol. Chem.* 260: 6175-8
- Garo, J, Kim, SR, Chung, YY, Lee, JM, An, G (1994) Developmental and environmental regulation of two ribosomal protein genes in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 25: 761-77
- Ito, T, Kim, GT, Shinozaki, K (2000) Disruption of an Arabidopsis cytoplasmic ribosomal protein S13-homologous gene by transposon-mediated mutagenesis causes aberrant growth and development. *Plant Journal* 22: 257-64
- Lambertsson, A (1998) The minute genes in *Drosophila* and their molecular functions. *Adv. Genet.* 38: 69-134
- Liu, X, Baird, WV (2003) Differential expression of genes regulated in response to drought- or salinity-stress from *Helianthus annuus* L. (sunflower). *Crop Science* 43: 678-687
- Ludwig, A, Tenhaken R (2001) Suppression of the ribosomal L2 gene reveals a novel mechanism for stress adaptation in soybean. *Planta* 212: 792-798
- Luo, M, Kong X, Huo N, Zhou R, Jizeng, JIA (2002) Gene expression profiling related to powdery mildew resistance in wheat with the method of suppression subtractive hybridization. *Chinese Science Bulletin* 47 (23): 1990-1994 23
- Oloriz, M I, Rojas, L, Gil, V, Jiménez E (2002) Librería sustractiva obtenida de un mutante de la variedad B 4362 con resistencia a la roya de la caña de azúcar. *Biotecnología Vegetal* 3: 179 -181
- Teixeira-Gomes, A P, Cloeckert, A, Zygmunt, MS (2000) Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infection and Immunity* 68: 2954-2961
- Volarevic, S, Stewart, MJ, Ledermann, B, Zilberman, F, Terracciano, L, Montini, E, Grompe, M, Kozma SC, Thomas, G (2000) Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* 288: 2045-2047
- Watt, DA (2003) Aluminium-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 385: 1163-1174
- Williams, ME, Sussex, LM (1995) Developmental regulation of ribosomal protein L16 genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 8: 65-76
- Wittmann-Leibold, B, Kopke, AKE, Arndt, E, Kromer, W, Hatakeyama, T, Wittmann, H-G (1990) Sequence comparison and evolution of ribosomal proteins and their genes. En: WE Hill, A Dahlberg, RE Garrett, PB Moore, D Schlessinger, JR Warner(eds), *The Ribosome, Structure, Function and Evolution*, pp 598-616. American Society of Microbiologists, Washington
- Wool, IG (1996). Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends in Biochemistry* 21: 164-165
- Yamaguchi, K, von Knoblauch, K, Subramanian, AR (2000) The plastid ribosomal proteins: identification of all the proteins in the 30 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J. Biol. Chem.* 275: 28455-28465
- Yamaguchi, K, Prieto, S, Beligni, MV, Haynes, PA, McDonald, HW, Yates, JR, Mayfield, SP (2003) Proteomic Characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplast Ribosome. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 33774-33785
- Zinn, AR, Ross, JL (1998) Turner syndrome and haploin sufficiency. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 322-327