



Centro
Andaluz
de Biología
del Desarrollo

¿Tienen axones los hongos?

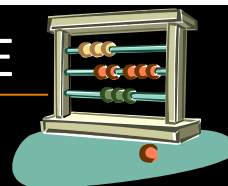
Antonio J. Pérez Pulido
Dpto. de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica
Centro Andaluz de Biología del Desarrollo
Universidad Pablo de Olavide

La Atrofia Muscular Espinal

1. Una enfermedad no tan rara



Frecuencia de la AME



- Enfermedad neuromuscular.
- Frecuencia de portador: 1/40 – 1/60 (1 millón en España).
- 1.500 familias conocidas en España y 100 nuevos casos al año.
- 1/6.000 – 1/10.000 nacimientos.



Enfermedad Rara

¿Qué es una enfermedad rara?

Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (Instituto de Salud Carlos III)

Las Enfermedades Raras, incluidas las de origen genético, son aquellas enfermedades con peligro de muerte o de invalidez crónica, que tienen una frecuencia (prevalencia) baja, menor de 5 casos por cada 10.000 habitantes en la comunidad (**1/2.000**), según la definición de la Unión Europea.

Medicamento rentable farmacéuticamente

Aquel medicamento que puede aplicarse a enfermedades con más de 5 casos por cada 10.000 habitantes en la comunidad (**1/2.000**).

Tipos de AME

La inteligencia
no se ve
afectada

Tipo	Inicio	Curso	Pronóstico
Tipo I – Severa (Werdnig-Hoffmann, AME aguda o infantil)	<i>In utero</i> – 6 meses	• A menudo debilidad extrema en el nacimiento, requiriendo soporte respiratorio e intubación. • Falta de movimiento normal y de desarrollo motor. • Implicación respiratoria y bulbar. • Fasciculación de la lengua. • Pobre control de la cabeza. • No se pueden sentar sin ayuda. • Es importante el diagnóstico precoz y el tratamiento de las infecciones respiratorias	• La causa más común de muerte neonatal por enfermedad genética. • Esperanza de vida hasta 3 años.
Tipo II – Intermedia (Werdnig-Hoffmann benigna)	6 meses – 3 años	• Debilidad de los músculos esqueléticos. • No se mantienen en pie ni pueden andar sin ayuda. • Pueden desarrollar fasciculaciones en la lengua y manos. • Pueden desarrollar escoliosis y contracturas en las articulaciones. • Pueden requerir soporte respiratorio en algún momento.	• Pronóstico mejor. • Frecuentemente tienen vidas normales, llegando a la edad adulta.
Tipo III – Juvenil (Kugelberg-Welander)	1 – 15 años	• Debilidad general de músculos esqueléticos. • Caminan sin ayuda durante un tiempo. • Requieren silla de ruedas antes de los 30 años. • Pueden desarrollar escoliosis, contracturas y fasciculación en las manos.	• La esperanza de vida normalmente no se ve afectada. • A veces estabilización durante años.
IV – Adulta	30 años	Variable	Variable

Otros síntomas de la enfermedad

Diálogos con Axel
Cuando seamos inmortales
José Antonio Fortuny

José Antonio Fortuny
Diálogos con Axel. Cuando seamos inmortales

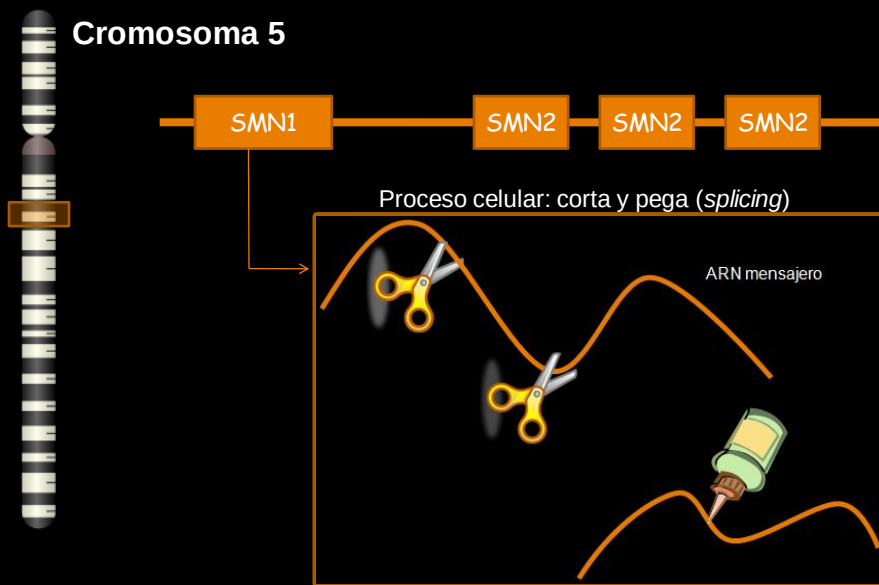
Alex (<http://www.adaptado.es>)

La Atrofia Muscular Espinal

2. Características a nivel molecular

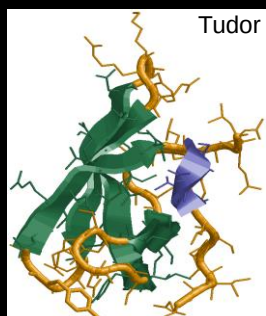


Genes ligados a la AME

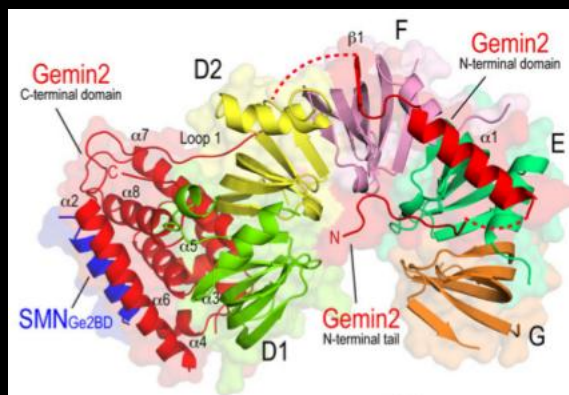


Complejo SMN

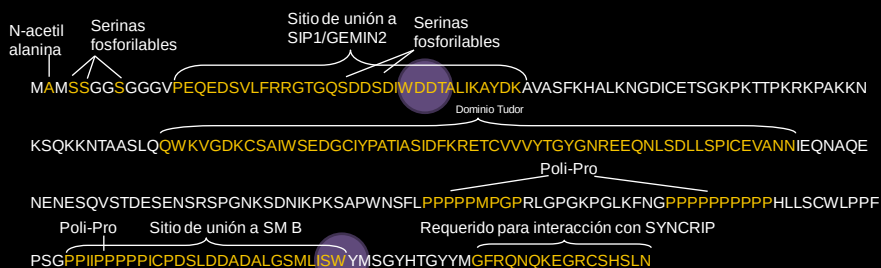
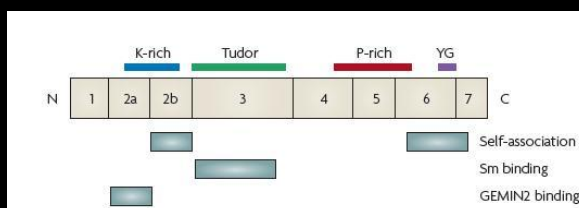
- Localización: Núcleo y citoplasma.
- SMN: 38 kD - 294 aas.
- Gemin2 (Sip1), ribonucleoproteínas Sm.



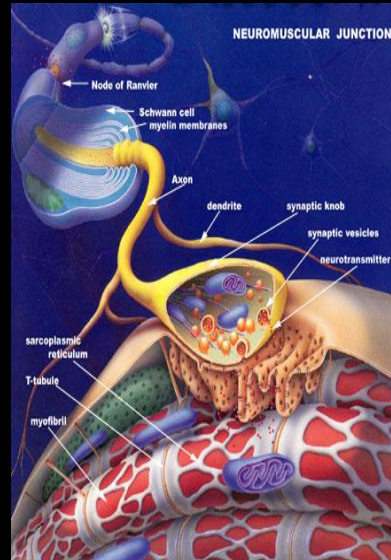
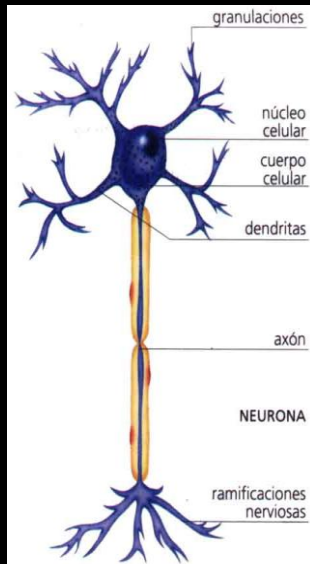
Compartido con SPF30



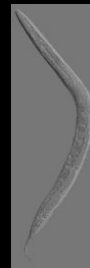
Dominios y motivos de SMN



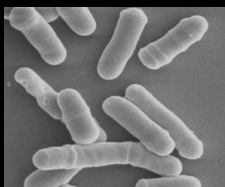
Función específica en neuronas



Organismos con ortólogos de SMN



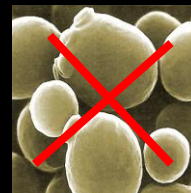
Schizosaccharomyces pombe



Nicholas Owen et al. HMG (2000)

These ascomycetes are not closely related in evolutionary terms and protein sequence comparisons have shown that *Schizosaccharomyces pombe* is as distant from *Saccharomyces cerevisiae* as it is from mammals (32). Approximately 40% of fission yeast genes contain introns, nearly half with more than one, unlike *S.cerevisiae* genes, which rarely have introns (33,34). The *Schizosaccharomyces pombe* gene structure is more similar to that of vertebrate genes than to that of *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae





Objetivos

- Comprobar la relación SMN/NIG (nº de intrones por gen).

Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Candida dubliniensis, Candida glabrata, Cryptococcus gattii, Cryptococcus neoformans, Debaryomyces hansenii, Encephalitozoon cuniculi, Encephalitozoon intestinalis, Eremothecium gossypii, Gibberella zeae, Kluyveromyces lactis, Lachancea thermotolerans, Magnaporthe grisea, Neurospora crassa, Pichia pastoris, Pichia stipitis, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Ustilago maydis, Yarrowia lipolytica, Zygosaccharomyces rouxii.

- Descubrir motivos de secuencia relacionados con la función de SMN en las neuronas.



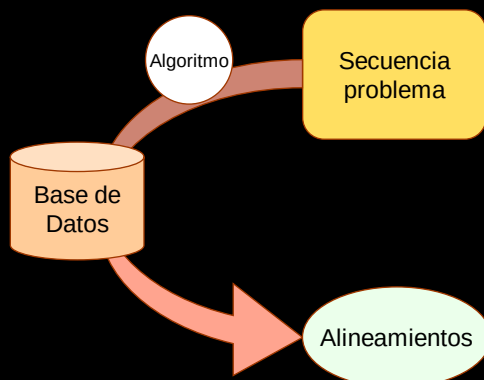
Resultados

1. Búsqueda de homólogos



Búsqueda de similitud

- Compara una secuencia problema con un conjunto de ellas, por medio de un algoritmo implementado en un programa bioinformático y genera una serie de alineamientos locales puntuados.



Alineamiento de dos secuencias

```

ALIGN calculates a global alignment of two sequences
version 2.0uPlease cite: Myers and Miller, CABIOS (1989) 4:11-17
seq1.fasta : 180 aa
sec_1                                     180 aa vs.
sec_2                                     176 aa
using matrix file: BLOSUM50, gap open/ext: -10/-2
scoring matrix: BLOSUM50, gap penalties: -10/-2
41.5% identity;      Global alignment score: 383

      10      20      30      40      50
seq_1 MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDSDIW--DDTALIKAYDKAVASFKHALKNGD
      :: ..      :: :: :::::::::::::: :::::::::::::::::::: ::
sec_2 MANGA-----ED-VVFCRGTGQSDSDIWERDDTALIKAYDKAVASFKNALKGED
      10      20      30      40

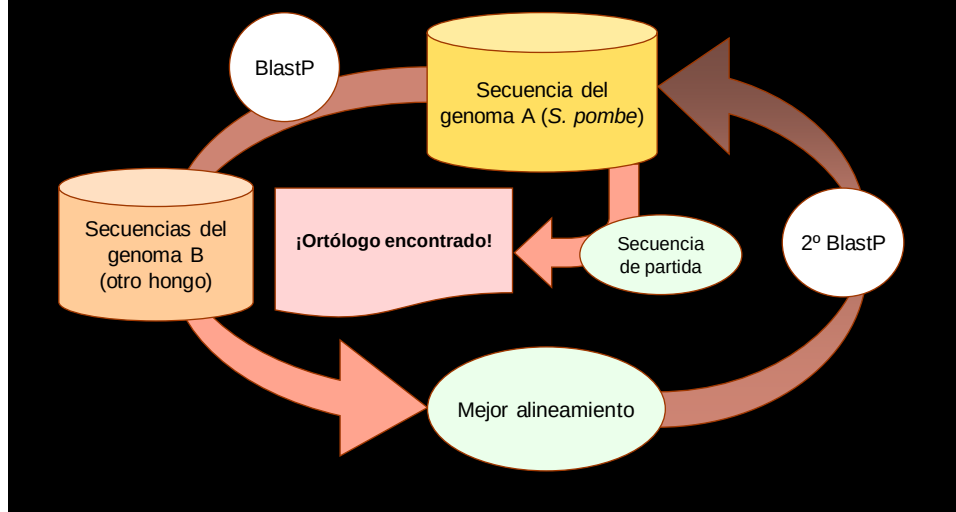
      60      70      80      90      100     110
seq_1 ICETKGKFKTTPKRRKPAKKNKSQKKNTAASLQQWKVGDKCSAIWSEDCGIYPATIASIDE
      . . . . . :: :: :::::::::: :::::::::::::::::::: ::
sec_2 GATPQENDNPGKKRKNKNNKNSRKRCNAAPDKQVGDSCYAFWSEDCNLYTATITSVDQ
      50      60      70      80      90      100

      120     130     140     150     160     170
seq_1 KRETCVVVYTGYNREEQNLS---DLLSPICEVANNIEQNAQENENESQVSTDESENS--
      . . . . . :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
sec_2 EKGACIFITYTDYGAEANPRTEPPDMDDEDGIDSAG-VKFTETTSEGADRIHTPKSGHAK
      110     120     130     140     150     160

      180
seq_1 -RSPGNKS
      :: ::
sec_2 HKSKSNFF
      170
  
```


Blast recíproco

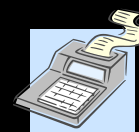
Blast cruzado. Doble blast utilizado para buscar ortólogos.



Ortólogos encontrados

Gene	Organism	Identifier	%Identity	E-value	Length (aas.)
Smn	<i>S.pombe</i>	Q09808	100%	0	152
	<i>A.nidulans</i>	C8V942	25%	1e-10	206
	<i>G.Zeae</i>	A2QHQ5	30%	5e-12	147
	<i>A.Niger</i>	XP_384567	28%	6e-07	152
	<i>M.grisea</i>	A4QYJ6	26%	4e-05	167
	<i>A.Fumigatus</i>	Q4WNN4	27%	5e-11	171
	<i>N.crassa</i>	Q7RY22	33%	5e-11	149
	<i>Y.lipolytica</i>	Q6C798	27%	7e-07	126
Spf30	<i>S.pombe</i>	O94519	100%	0	311
	<i>C.neoformans</i>	Q5KKF2	22%	5e-10	229
	<i>C.gatti</i>	E6R3I4	22%	8e-08	250
	<i>A.nidulans</i>	C8VBJ7	31%	1e-13	289
	<i>A.niger</i>	A2QX86	30%	1e-19	291
	<i>G.zeae</i>	XP_388559	27%	2e-09	279
	<i>A.fumigatus</i>	Q4WMG8	29%	2e-17	297
	<i>N.Crassa</i>	Q7S6P1	26%	3e-15	370
	<i>U.maydis</i>	Q4P543	20%	2e-05	247

Expressed Sequence Tag (EST)



Resultados

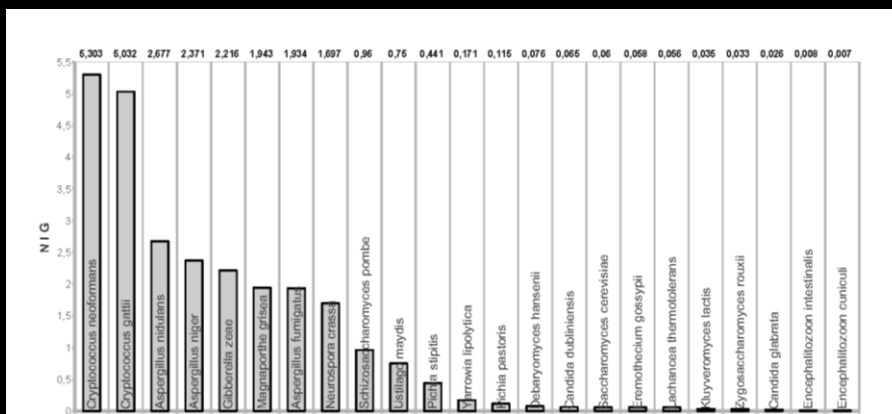
2. Cálculo del número de intrones por gen



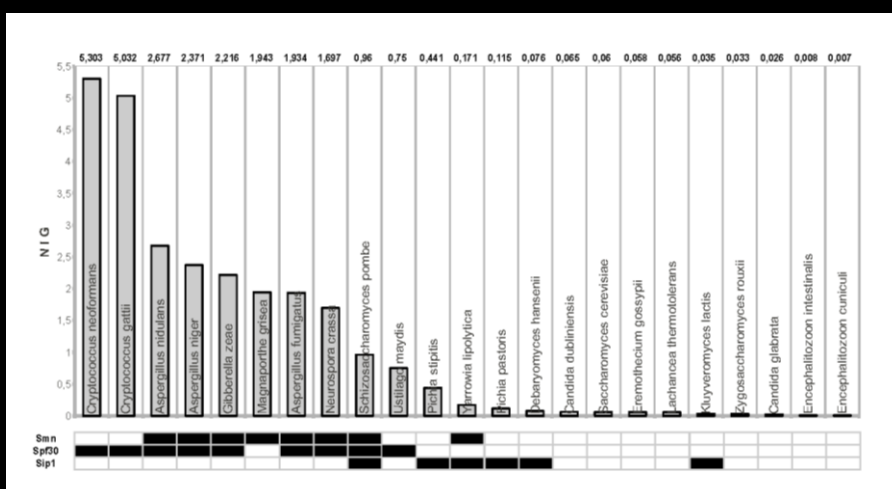
Contando el nº de intrones

Other Features		1 #!/usr/bin/perl	
Base range:	1 - 1266	2	
next >>		3 my @F = `ls *.gbk`;	
gene	order(U43876.1:575..762,U43877.1:1..U43881.1:1..251,U43882.1:1..244,1..12	4 my \$cuenta;	
gene	SMN	5 my \$total;	
mRNA	join(U43876.1:575..688,U43877.1:104..U43880.1:69..221,U43881.1:103..198,	6 my \$cds;	
gene	SMN	7 my \$fraccion;	
product	survival motor neuron	8 foreach my \$F (@F) {	
note	spinal muscular atrophy gene; cDNA se	9 #print \$F;	
CDS	join(U43876.1:608..688,U43877.1:104..U43880.1:69..221,U43881.1:103..198,	10 chomp \$F;	
codon_start	1	11 open FICHERO,\$F;	
gene	SMN	12 my (@fichero)=<FICHERO>;	
product	survival motor neuron	13 my \$fichero;	
note	spinal muscular atrophy gene	14 foreach (@fichero) {	
translation	MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFPRGTGQSDD;QKQNTAASLQQWKVGDKCSAIWSEDGCIYF;NESQVSTDESENRSRPGNKSNDNIKPSAPW;PIIPPPFFPICDSDLDDADALGSMILISVYMS	15 chomp \$;	
		16 \$fichero .= \$_;	
		17 }	
		18 \$fichero=();	
		19 while (\$fichero=~ / CDS (.+?)\//g)	
		20 {	
		21 # print "\$1\n";	
		22 my \$secu=\$1 "";	
		23 my \$comas=0;	
		24 (\$comas)=\$secu=~ s/./,/g if \$secu=~/,/;	
		25 \$cuenta(\$comas)++;	
		26 \$total+=\$comas;	
		27 \$cds++;	
		28 #print "\$secu\t\$cumas\n";	
		29 }	
		30 ;	
		31 \$fraccion=\$total/\$cds;	
		32 foreach \$comas (sort {\$a<=>\$b} keys %cuenta){	
		33 print "\$comas \$cuenta(\$comas)\n";	
		34 print "numero de genes: \$cds\n";	
		35 print "numero total de intrones \$total\n";	
		36 print "numero de intones por gen \$fraccion\n";	
		37 close FICHERO;	

SMN y SPF30 se relacionan con el nº de intrones



SMN y SPF30 se relacionan con el nº de intrones

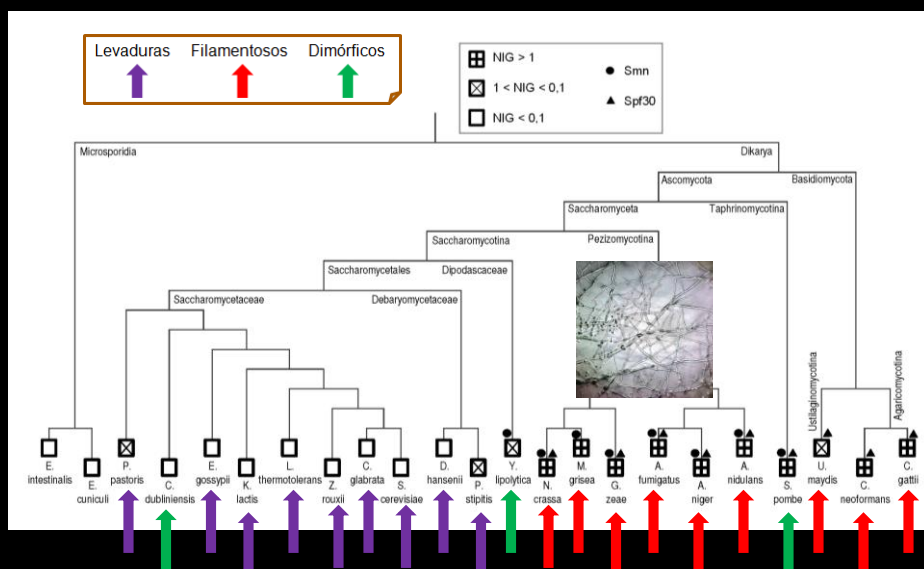


Resultados

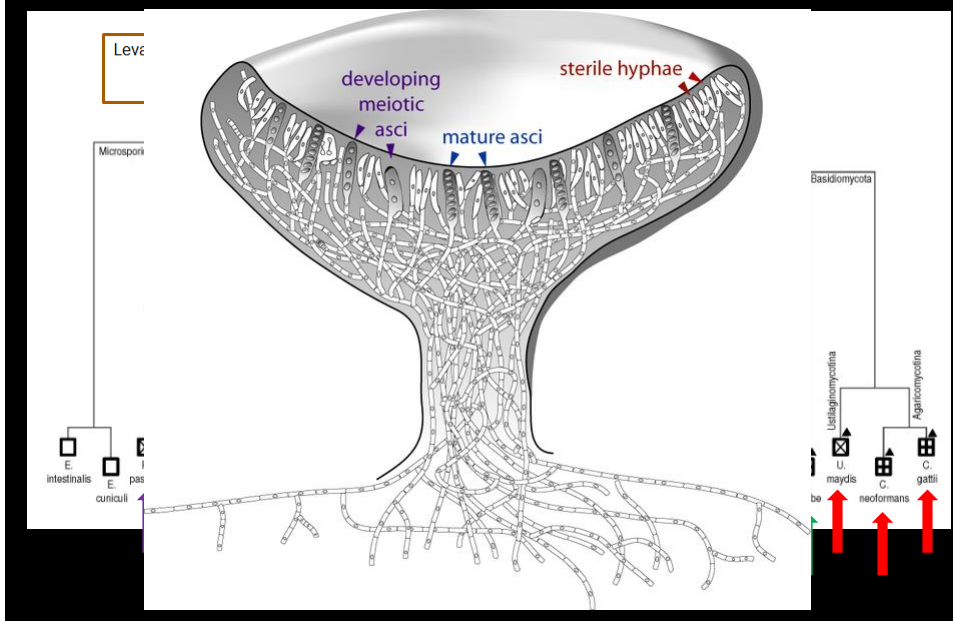
3. Pero entonces: ¿tienen axones los hongos?



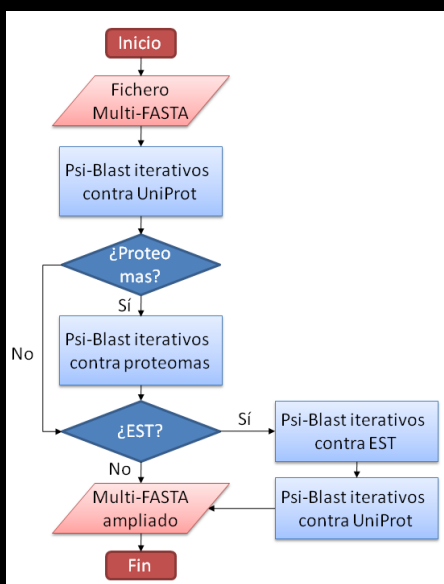
Filogenia de los hongos



Filogenia de los hongos



Búsqueda automática de ortólogos



chinnella spiralis, Trichomonas vaginalis, Trichophyton eggum ca.

r'' secuencias.

reino Protista.