

ANÁLISIS FUNCIONAL DE GENES QUE PARTICIPAN EN LA ELABORACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS EN *Sporothrix schenckii*

Muñoz Sánchez Ariel Hernán (1), López Ramírez Luz Adriana (2), Mora Montes Héctor Manuel (3)

1 [Licenciatura en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | [arihems@live.com.mx]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [aadrianitas@hotmail.com]

3 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [hmora@ugto.mx]

Resumen

La esporotricosis es una micosis subcutánea causada por el hongo *Sporothrix schenckii*. Es una enfermedad mundialmente extendida, sin embargo, se sabe poco sobre sus factores de virulencia. Es en la pared celular de los patógenos fúngicos donde se regulan todas las interacciones huésped-patógeno, y el estudio de sus componentes es de vital importancia, siendo poco conocidos los compuestos de la pared de *S. schenckii*. La glicoproteína PRM es la más abundante de la pared de ese hongo, y en su síntesis participan enzimas llamadas ramnosiltransferasas. Los genes que participan en la síntesis de estas enzimas son aún desconocidos. En este trabajo estamos interesados en silenciar la expresión del gen 06451, presuntamente implicado en la síntesis de estas enzimas. Esto para que en estudios posteriores se pueda determinar su papel en este proceso. Para esto se transformó a *S. schenckii* con un casete molecular de silenciamiento para este gen, previamente elaborado, usando una transformación con *Agrobacterium tumefaciens*.

Abstract

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by the fungus *Sporothrix schenckii*. It is a widespread disease. However, little is known about its virulence factors. It is in the cell wall of fungal pathogens that all host-pathogen interactions are regulated, and the study of its components is of vital importance, with the compounds of the wall of *S. schenckii* being poorly known. PRM is the most abundant glycoprotein of the wall of this fungus, and is elaborated by enzymes called rhamnosyltransferases. The genes involved in the synthesis of these enzymes are still unknown. In this work, we are interested in silencing the expression of gene 06451, presumably involved in the synthesis of these enzymes. For this, *S. schenckii* was transformed with a molecular silencing cassette for this gene, previously elaborated, using a transformation with *Agrobacterium tumefaciens*.

Palabras Clave

Pared celular, glicoproteínas, transformación, silenciamiento génico

INTRODUCCIÓN

Sporothrix schenckii es el agente etiológico de la esporotricosis, una micosis subcutánea de humanos y otros mamíferos. Sus reservorios naturales (fuentes potenciales de infección) están relacionados con la vegetación descompuesta, plantas espinosas, astillosas, tierras de alfarería y musgo, e incluso animales, todos estos contaminados con el hongo. La micosis puede presentarse en dos formas: lesiones cutáneas y linfocutánea, esta última asociada a pacientes inmunodeprimidos. [1] Aunque la esporotricosis es una enfermedad mundialmente extendida, es característica de regiones tropicales y subtropicales. Es considerada la micosis subcutánea más difundida en todo el mundo. En México es la causa más frecuente de micosis subcutánea y linfocutáneas. Estudiar los factores de virulencia que tiene este microorganismo es clave para poder comprender cómo se establece la enfermedad. [2]

Los patógenos del género *Sporothrix* exhiben un fenotipo termodimórfico: en su etapa saprofitica o en cultivo *in vitro* a 25 ° C el hongo crece con su forma filamentosa con células conidiógenas simpodiales que producen esporas. Durante la fase parásita, el hongo se encuentra como células de levadura a una temperatura de 37 °C. Este dimorfismo es esencial para la virulencia en el huésped mamífero. Además de este dimorfismo, el conocimiento actual sobre los factores de virulencia de *Sporothrix* sigue siendo escaso. [3]

La pared celular de hongos suele ser un tema importante de estudio en la investigación de patógenos fúngicos, ya que la pared celular protege a la célula de factores externos. Además, es en ésta donde se regulan todas las interacciones huésped-patógeno y puede ser un factor de modulación que afecta la respuesta inmune del anfitrión. Por lo tanto, los componentes de esta se consideran relevantes para la virulencia del hongo. [4]

La pared celular de hongos está compuesta principalmente de glicoconjugados: polisacáridos estructurales tales como quitina y β -glucanos y las glicoproteínas. [5]

Las glicoproteínas son componentes clave de la pared celular de *S. schenckii*, pero hasta el

momento se sabe poco sobre sus vías biosintéticas, así la relevancia funcional que tienen en la pared celular. [6] La glicoproteína más abundante en *S. schenckii* es la llamada “peptidoramnonana” (PRM). Ésta presenta la característica de tener uno o dos residuos de ramnosa, un carbohidrato muy raro de encontrar en otros patógenos fúngicos humanos. La PRM ha sido de especial interés por su inusual estructura y relevancia durante la detección inmune de las células de *S. schenckii*. Tiene la capacidad de estimular la producción de anticuerpos circulantes, pero también se han relacionado con esta molécula las actividades inmunosupresoras. [4] La glicosilación de proteínas es una modificación post-traducciona que se encuentra prácticamente en todas las células eucariotas. Las enzimas que llevan a cabo esta glicosilación de las PRM al agregar los residuos de ramnosa son las llamadas ramnosiltransferasas, que se sabe adicionan residuos de UDP-Ramnosa a estas glicoproteínas. Los genes que sintetizan estas enzimas son hasta ahora desconocidos. [3]

Se tiene identificado un gen que está presuntamente implicado en la síntesis de ramnosiltransferasas. Este gen es llamado 06451. Para determinar su función en este proceso puede silenciarse la expresión de este gen. Utilizando el principio del silenciamiento génico post-transcripcional, se puede llevar a cabo tal objetivo, llevando a cabo una construcción molecular de un gen que contenga secuencias del sentido y antisentido del gen estudiado. Esta construcción molecular se inserta en el genoma de *S. schenckii*, realizando una transformación con *Agrobacterium tumefaciens* para que de esta forma se lleve a cabo el silenciamiento génico del gen 06451.

MATERIALES Y MÉTODOS

La construcción molecular del gen 06451 fue llevada a cabo anteriormente por el equipo de trabajo. La primera parte del procedimiento consistió en obtener el fragmento del gen 06451. Para esto, fue amplificado este gen ligándolo al vector pJET, obteniéndose el vector “pJET 06451”, para posteriormente transformar a *Escherichia coli* DH5 α . Después, se estriaron las bacterias en medio LB con ampicilina para seleccionar las transformadas.

Una vez obtenida las bacterias transformadas, se procedió a suspender algunas de las colonias obtenidas en un medio LB líquido con ampicilina, y se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente se procedió extraer el vector pJET 06451 que contenían estas bacterias. Para esto, se transfirieron a tubos de 1.5 ml la suspensión bacteriana y se centrifugaron por 3 minutos a 11000rpm. Se resuspendió el pellet de bacterias en 50µl del mismo medio y se añadió 1µl de RNasa. Posteriormente se agregó 300µl de solución TENS y 150µl de acetato de sodio 3M pH 5.2. Se centrifugo esta solución y se extrajo el DNA plasmídico con 900µl de etanol al 100% y se resuspendió en 50µl de agua.

Posteriormente se realizó una digestión enzimática al plásmido recién extraído, con la intención de poder obtener el fragmento del gen 06451. El corte se realizó usando las enzimas de restricción SacI y PstI, realizando en un principio el corte con la enzima SacI. Se dejó incubar esta reacción por 3 horas a 37°C, y después se purificó usando 30µl de TE y 20µl de PEG, para entonces cortar el fragmento ahora con la enzima PstI incubando a las mismas condiciones. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa convencional al 1.5% para separar los fragmentos obtenidos en la reacción de digestión. A partir de esta se purificó el fragmento del gen 06551 empleando kit de purificación UltraClean®.

Una vez obtenido el fragmento del gen 06451, se clono ahora dentro del vector pBGgHg. Para esta ligación, se usaron 2µl de pBGgHg previamente cortado con enzimas SacI y PstI, 2µl del fragmento, 1µl de ligasa, 1µl de Buffer de reacción y 4µl de agua. La ligación se realizó a 20°C por 18hrs. Entonces se realizó una transformación usando bacterias de *E. coli* DH5α, induciéndoles un estado de competencia por shock térmico, y se sembraron en medio LB con kanamicina para seleccionar a las bacterias transformantes. Se incubaron a 37°C toda la noche, para después extraer el DNA plasmídico de estas. Se realizó entonces dos reacciones de PCR del gen 06451, amplificando en un principio la región del promotor de triptófano a la de región sentido y de la región de antisentido a la región del terminador del triptófano, programando las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo a 94°C durante 5min, 35 ciclos de 94°C por 30seg, 62.3°C por 30seg y 68°C por 3 min y finalmente 1 ciclo a 72°C durante

7min por 34 ciclos. Esto para comprobar que la ligación fue exitosa y el plásmido extraído contenía el gen 06451.

Se realizó la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* utilizando la cepa Agl1. Para esta transformación se adicionó 20µl de plásmido a 50µl de una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens*. Se congelo la mezcla con nitrógeno líquido y se incubó la mezcla a 37°C por 5 minutos. Se adicionó entonces 250µl de medio LB. Se incubo a 28°C por 3 horas. Una vez hecho esto se sembró las bacterias en medio LB con kanamicina.

Se seleccionaron las bacterias transformadas y se realizaron las mismas pruebas para comprobar la presencia del vector pBGgHg con el gen 06451. Se procedió entonces a transformar a *S. schenckii* con *A. tumefaciens*. Para esto se realizó un medio de inducción con 3ml de sol. 20x mm (0.5 M fosfatos y 0.5 M salina), 2.4ml de MES 1M, 0.6ml de glicerol 50%, 0.6ml de glucosa, y 24µl de acetoseringona, todo esta mezcla se llevó a un volumen 60ml de con agua estéril destilada y se agregó agar. Se mezclaron 100µl de *Agrobacterium tumefaciens* ya transformadas y 100µl de conidias de *Sporothrix schenckii* 5x10⁶ cel/ml en las placas de medio inductor y se incubaron por 3 días a 28°C. Se resembraron entonces el contenido de estas placas en 400ml de medio YPD con 3.2ml de higromocina y 76.8µl de cefotaxina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al momento de analizar la extracción del vector pJET 06451 se obtuvo el siguiente patrón electroforético, como se muestra en la figura 1.

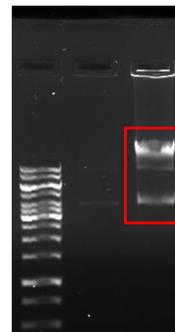


FIGURA 1: Extracción del plásmido pJET 06451.

Para analizar la reacción de digestión con las enzimas de restricción *SacI* y *PstI* del vector pJET 06451 se obtuvieron en una electroforesis el patrón electroforético con los fragmentos correspondientes del fragmento de 06451 y el vector pJET (Figura 2).

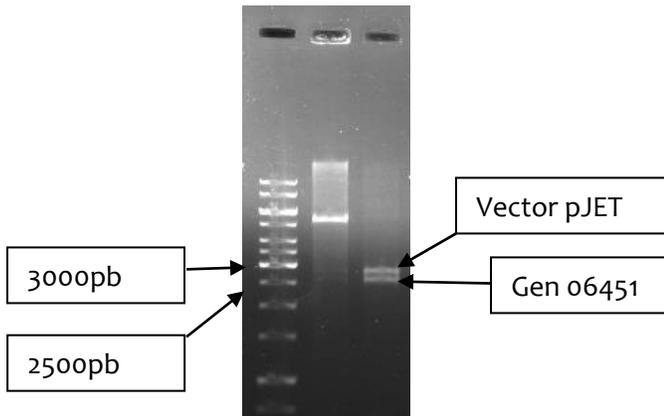


FIGURA 2: Digestión de pJET06451 usando las enzimas de restricción *SacI* y *PstI*. Se logran observar el fragmento de 2768pb correspondiente a la construcción molecular del gen 06451, junto con otro fragmento de 2974pb correspondientes al vector pJET.

Al obtener estas bandas del gen de interés, se procedió a la purificación de éste mediante una electroforesis. Una vez hecho esto, la purificación del fragmento del gen 06451 se comprobó con una electroforesis que se muestra en la figura 3.

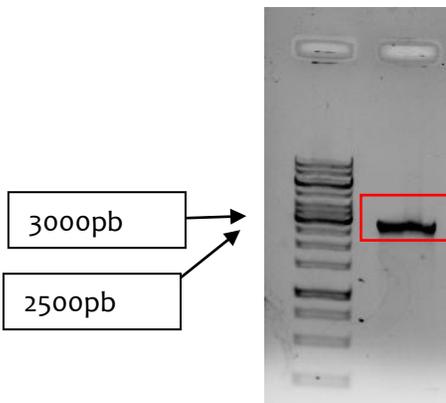


FIGURA 3: Purificación del gen 06451.

Este fragmento se ligó en el vector pBGgHg, para la clonación del gen. Con este vector se transformó a las bacterias de *E. coli* DH5 α , para posteriormente extraer el plásmido. Esta

extracción se comprobó y se analizó en la electroforesis mostrada en la figura 4.

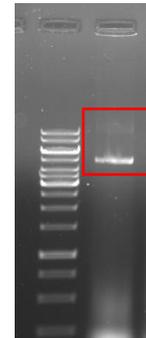


Figura 4. Extracción del vector pBGgHg con el gen 06451.

Al analizar la electroforesis anterior, se observó el corrimiento que tenía cada patrón electroforético, seleccionándose muestras que tenían un corrimiento distinto a las demás y a estas se les realizó una PCR de la construcción del gen 06451. Esta se realizó desde el promotor del triptófano al sentido del gen. Se pudo comprobar que el gen 06451 si fue clonado dentro del vector pBGgHg en 2 muestras. (Figura 5).

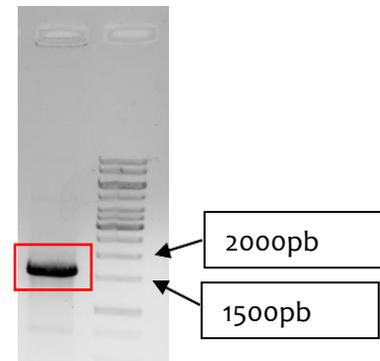


Figura 5. PCR de la región desde el promotor del triptófano al sentido del gen 06451, en el vector pBGgHg de la transformante. Pueden observarse las bandas de 1600pb correspondientes al producto de PCR.

Una vez comprobada la ligación de la construcción molecular de silenciamiento del gen 06451 con el vector pBGgHg, se procedió a transformar *A. tumefaciens Agl1*. Para comprobar que la transformación de esta bacteria tuviera el vector de interés, se realizaron las mismas pruebas anteriores. (Figura 6).

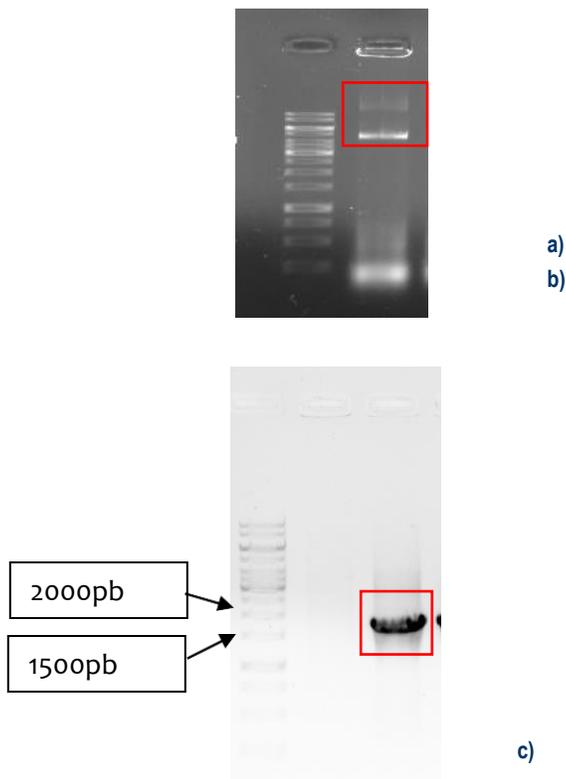


Figura 6. a) Extracción del plásmido pBGgHg a partir de *Agrobacterium tumefaciens* ya transformada. b) PCR de la región desde el promotor del triptófano al sentido del gen 06451, en el vector pBGgHg de la transformante.

Una vez comprobada la transformación de *A. tumefaciens* *Agl1*, se procedió a la transformación de *S. schenckii*. Dicho procedimiento se realizó, sin embargo, se requieren análisis posteriores para comprobar que esta última transformación fue eficiente.

CONCLUSIONES

Se realizó la transformación de *Sporothrix schenckii* con el vector pBGgHg que contenía la construcción molecular de silenciamiento del gen 06451, sin embargo, hasta este momento no se puede confirmar que se haya dado la transformación y que se esté llevando a cabo el silenciamiento génico.

REFERENCIAS

[1] Josefina Ayats Ardite, Servicio de Microbiología. Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. Hospitalet de Llobregat (Barcelona). Control Calidad SEIMC. Consultado el 11 de julio de 2017. Recuperado de: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/espuro.pdf>.

[2] Pérez Morales, L., Iglesias López, M., Quiñones Cherta, O., Reyes Rodríguez, I. (2014). Aislamiento microbiológico de *Sporothrix Schenckii* en un paciente inmunodeprimido. Presentación de un caso. *Medisur* vol.12 no.4.

[3] Marcus M T., Luiz GP de Almeida², Kubitschek-Barreira, P., L Alves, F., S Kioshima, E., KR Abadio. A, Fernandes, L., S Derengowski, L., S Ferreira, K., C Souza, R., C Ruiz, J., C de Andrade, N., C Paes, H., M Nicola, A., Albuquerque P., L Gerber, A., P Martins,V., DF Peconick. L., Viggiano N, A., B Chaucanez, C., A Silva, P., L Cunha. O., FM de Oliveira, F., C dos Santos, T., LN Barros, A., A Soares, M., M de Oliveira, L., M Marini, M., Villalobos-Duno, H., ML Cunha, M., Sybren de Hoog, Silveira, J. F., Henrissa, B., Niño-Vega. G. A., Cisalpino, P. S., Mora-Montes, H. M., Almeida, S. R., Stajich, J. E., Lopes-Bezerra, L. M., Vasconcelos, A. T., S

Felipe, M. S. (2014). Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *BMC Genomics*, 15:943. doi:10.1186/1471-2164-15-943

[4] Mora-Montes, H. M., Silva Dantas, A., Trujillo-Esquivel, E., Souza Baptista, A. R., Lopes-Bezerra, L. M.. (2015). Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era. *FEMS Yeast Research*. Vol. 15, No. 6 doi: 10.1093/femsyr/fov065

[5] López-Romero, E., Reyes-Montes, M. R., Pérez- Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagómez-Castro, J. C., Mora-Montes, H. M., Flores-Carreón, A., Toriello, C. (2011). *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiology*. 6(1).

[6] Martínez-Álvarez, J. A., Pérez-García, L. A., Mellado-Mojica, E., G. López, M., Martínez-Duncker, I., López-Bezerra, L. M., Mora-Montes, H. M. (2017) *Frontiers in Microbiology*. Volume 8|Article 843 doi: 10.3389/fmicb.2017.00843