

Análisis funcional de genes que participan en la elaboración de glicoproteínas en *Sporothrix schenckii*

Josefina Ivonne Rascón Guerrero (1), Héctor Manuel Mora Montes (2)

1 [Ingeniería en Industrias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Ciudad Cuauhtémoc] | Dirección de correo electrónico: [jirasconguerrero@hotmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [hmora@ugto.mx]

Resumen

Sporothrix schenckii, es un hongo dimórfico, integrante del complejo *S. schenckii*, que se desarrolla en forma micelial (forma saprófita) o levaduriforme (forma patógena) y es el agente etiológico de la esporotricosis, una micosis subcutánea de los mamíferos que se adquiere por inoculación traumática del hongo. Este organismo, es un modelo interesante para estudiar la base bioquímica, genética, molecular y fisiológica de la diferenciación celular y morfogénesis. Sin embargo, a pesar de los significativos avances en el conocimiento de la filogenia y la virulencia de dicho organismo, existe una disponibilidad limitada de herramientas para el estudio, con enfoques genéticos y/o moleculares.

Aquí se describe la generación de un casete de interrupción para el silenciamiento del gen *ACE2* de *S. Schenckii*, cuyo producto participa en el crecimiento celular y la morfogénesis fúngica. La construcción de dicho vector permitirá analizar la relevancia de este gen durante la interacción de *S. schenckii* con el hospedero.

Abstract

Sporothrix schenckii is a dimorphic fungus that grows as mycelial (saprophytic form) or yeast (pathogenic form) and is the etiological agent of sporotrichosis, a subcutaneous mycosis of mammals that is acquired by traumatic inoculation of the fungus.

This organism is an interesting model to study the biochemical, genetic, molecular and physiological basis of cell differentiation and morphogenesis. So far, there is a significant advance in the knowledge about their phylogeny, susceptibility to antifungal drugs and virulence attributes, there is limited availability of tools to study this organism with genetic and/or molecular approaches.

Here, we describe the generation of a disruption cassette for the silencing of *S. schenckii ACE2*, a gene involved in cell growth and morphogenesis. The construction of this vector will allow us to analyze the relevance of this gene during the *S. schenckii*-host interaction.

Palabras Clave

Crecimiento fúngico; biología molecular; *Sporothrix schenckii*; factor de transcripción; silenciamiento génico

INTRODUCCIÓN

Sporothrix schenckii es el agente causante de la esporotricosis, una micosis subcutánea que afecta a capas más profundas de la piel, las lesiones suelen iniciar por infección de una pequeña herida o abrasión, por esta razón es un riesgo ocupacional para agricultores, mineros y trabajadores que están en contacto con el suelo. [1].

Las glicoproteínas son los componentes clave de la pared celular de *S. Schenckii*, pero poco se sabe acerca de su ruta biosintética. [2,3]

La pared celular fúngica es un modelo para estudiar, desde un punto de vista molecular, la morfogénesis de una estructura tridimensional y su relación con el crecimiento y diferenciación celular. [4,5]

En *S. Schenckii*, el gen *ACE 2* se encarga de codificar un factor de transcripción implicado en la regulación de la morfogénesis. [6]

Para que un gen o una secuencia particular de DNA pueda ser analizada, primero debe aislarse del genoma de la célula u organismo. Posteriormente, el DNA deseado debe obtenerse en su forma pura y en cantidades adecuadas para el análisis molecular, esto puede lograrse mediante procedimientos que se denominan en su conjunto tecnología del DNA recombinante. [7]

Parte de un genoma o todo éste puede cortarse en fragmentos de un tamaño útil utilizando una o más enzimas de restricción, las cuales rompen ambas cadenas del DNA de doble cadena en sitios específicos para cada una de las enzimas conocidas, y a esto se le llaman secuencias diana. Los fragmentos cortados se separan de acuerdo con su longitud por medio de migración en un gel bajo la influencia de un campo eléctrico. Durante dicha electroforesis en gel, los fragmentos cada vez más cortos se mueven progresivamente más rápido a través del gel y los fragmentos de restricción pueden entonces aislarse y analizarse. [7]

Las series de los fragmentos de restricción de la colección genómica se incuban con DNA de vector, el cual también ha sido cortado con enzimas de restricción. Algunas de las moléculas de la mezcla serán el DNA del genoma empalmado al DNA vector mediante el apareamiento de las bases de

los extremos expuestos de las cadenas aisladas que han resultado de rupturas escalonadas por las endonucleasas de restricción. [7]

El DNA vector sirve para proporcionar al gen de interés, un mecanismo de entrada a una célula huésped, accediendo así a los sistemas de replicación del DNA, garantizando su transferencia a las diversas generaciones celulares. Los vectores principales son el DNA viral o plásmidos, moléculas de DNA dispensables que pueden existir y replicarse en forma independiente del genoma del huésped en la célula huésped. [7]

Por medio de métodos apropiados para examinar las colonias de células anfitrionas se pueden identificar y aislar las colonias deseadas que lleven un DNA recombinante. [7]

En este trabajo se pretenden emplear herramientas de biología molecular e ingeniería genética para generar un casete molecular para el silenciamiento del gen *ACE2* de *S. Schenckii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos y condiciones de cultivo

Los organismos usados en este estudio se enlistan en la Tabla 1. Las células fueron mantenidas a 37°C en medio LB (1% [m/v] peptona de gelatina, 0.5% [m/v] extracto de levadura, 0.5% [m/v] cloruro de sodio, 2% [m/v] agar bacteriológico) complementado con ampicilina (1 µL/ml).

Tabla 1. Tabla 1: Organismos utilizados en esta investigación

Cepas	Genotipo
<i>Escherichia coli</i>	DH5α
<i>Sporothrix schenckii</i>	4821

Extracción de DNA plasmídico

Las células de *Escherichia coli* que contenían el plásmido fueron incubadas por 24 horas a 37°C en medio LB con antibiótico. Se colocaron 1.5 mL del medio con bacterias en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó por 30 segundos a 10,000 rpm. Tras

eliminar el sobrenadante, se agregaron 300 μL de solución TENS [Buffer TE 0.1 N NaOH, 0.5% dodecil sulfato de sodio], y 150 μL de acetato de sodio 3 M, pH 5.2.

Se centrifugó por 5 minutos a máxima velocidad. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 ml nuevo. Se colocaron 900 μL de etanol al 100%, se procedió a centrifugar nuevamente la muestra por 3 minutos a máxima velocidad y se desechó el sobrenadante. La muestra fue lavada con 400 μL de etanol al 70%, luego se centrifugó por 3 minutos a máxima velocidad. Se dejó secar el precipitado obtenido a temperatura ambiente por 30 minutos y se agregaron 20 μL de agua para resuspender el DNA plasmídico. Finalmente se analizaron las muestras con una electroforesis en gel de agarosa.

Amplificación del DNA plasmídico por PCR
Mediante una reacción de PCR, utilizando 0.04 μL enzima Pfx de Invitrogen, 0.5 μL de buffer para la enzima Pfx, 0.3 μL de sulfato de magnesio, 0.2 μL de oligonucleótido iniciador TtrpC, 0.2 μL de oligonucleótido iniciador de PtrpC, 3.26 μL de agua y 0.5 μL de DNA plasmídico. Una vez terminada la reacción de PCR, se analizó por electroforesis en gel el DNA plasmídico del vector Psilent. Se retiró el fragmento del gel de agarosa a la altura del marcador de 3000 pb. **Purificación de DNA plasmídico**

El gel de agarosa que contenía el DNA plasmídico fue fundido en un tubo Eppendorf con 300 μL de Gel Bind por cada 0.1 mg de agarosa a 55°C por 5 minutos, luego se colocó la muestra en un tubo Eppendorf con columna, se centrifugó por 30 segundos a 10,000 rpm, se volvió a circular el sobrenadante por la columna, nuevamente se centrifugó por 30 segundos a 10,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 300 μL de Gel Wash. Se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos, se circuló nuevamente el sobrenadante por la columna y se centrifugó. Tras desechar el sobrenadante, se agregaron 20 μL de agua a 60°C y se centrifugó por 30 segundos a 10,000 rpm.

Reacción de ligación al vector pJet

La reacción de ligación del vector pJet 1.2 se realizó con 2 μL del fragmento de DNA plasmídico, 0.5 μL de la enzima T4 DNA ligasa, 0.5 μL del vector pJet 1.2, 5 μL de la solución buffer 2X para pJet 1.2 y 2 μL de agua, luego se incubó por 2 hrs a temperatura ambiente.

Transformación con DNA plasmídico

Se adicionó el DNA plasmídico a células de *E. coli* químicamente competentes y se dejaron incubar por 30 minutos en hielo. A continuación, se incubaron en Termobañó a 42°C por 50 seg, de inmediato se colocó la muestra en hielo por 2 minutos. Se adicionaron 200 μL de medio LB a la muestra y se dejó incubar con agitación a 250 rpm y a 37°C por 1 hr. Inocular la muestra en placas con agar LB con antibiótico.

Digestión con Sac I y Pst I

Para la digestión para Sac I se realizó una reacción con 3 μL de DNA plasmídico, 0.5 μL de ribonucleasa, 0.5 μL de Sac I, 0.5 μL de solución buffer para Sac I y 5 μL de agua. Se colocó dicha reacción en el termobañó a 37°C por 3 hrs.

Se agregaron 20 μL de solución PEG y 30 μL de solución TE, luego se centrifugó por 10 minutos a 10,000 rpm.

A continuación se llevó a cabo la digestión para Pst I con una reacción de 0.5 μL de Pst I, 1 μL de solución buffer para Pst I y 10 μL de agua. Se colocó dicha reacción en el termobañó a 37°C por 3 hrs y se analizó mediante electroforesis en gel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un fragmento de 306 pb del gen *ACE2* de *S. schenckii* mediante RT-PCR, tanto para sentido como para anti-sentido del gen, luego se realizó una electroforesis en gel y se purificó la parte del gel de agarosa donde se encontraba el fragmento de RNA, para después ligarse en el vector pJet y transformarse.

Posteriormente se digirió el fragmento con las enzimas Xho I y Hind III para el sentido y con las enzimas Stu I y Bgl II para el anti-sentido, luego se realizó una electroforesis en gel.

Una vez cortado la parte del gel de agarosa que contiene el sentido del gen *ACE 2* de *S. Schenckii*, se procedió a purificar y se ligó en el vector pSilent.

Para el anti-sentido, tras purificar la parte del gel de agarosa, se ligó en el vector pSilent que contenía el sentido, obteniendo finalmente la construcción del casete de silenciamiento para el gen *ACE 2* de *S. Schenckii*. En la imagen 1 se muestra el diagrama para la obtención del casete de silenciamiento.

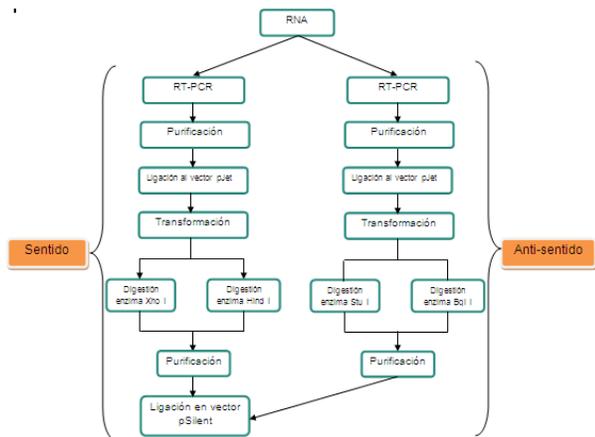


IMAGEN 1: Diagrama para la obtención del casete de silenciamiento para el gen *ACE 2* en *S. Schenckii*.

Al haber obtenido el casete de silenciamiento, se extrajo el DNA plasmídico de las células químicamente competentes, luego se procedió a realizar una reacción de PCR con la enzima Pfx. En la Imagen 2 se muestran los resultados de la electroforesis en gel donde se muestra la presencia de la banda cercana a 2800 pb que contiene el DNA plasmídico, se procedió a purificarlo a partir del gel de agarosa.

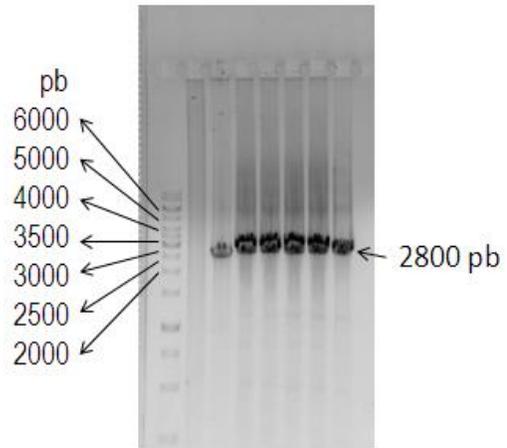


IMAGEN 2: Amplificación por PCR del DNA plasmídico de Psilent *S. schenckii* del gen *ACE2* con la construcción sentido más anti-sentido.

Tras purificar, se obtuvieron dos eluidos, eligiendo el segundo eluido para realizar la ligación al vector pJet, para luego llevar a cabo una transformación. En la Imagen 2 se muestran las bandas obtenidas de la electroforesis en gel realizada a las muestras transformadas del DNA plasmídico en el vector pJet que contiene el casete de silenciamiento para el gen *ACE2* de *S. schenckii*, las bandas de las muestras positivas tiene un tamaño de 2800 pb.

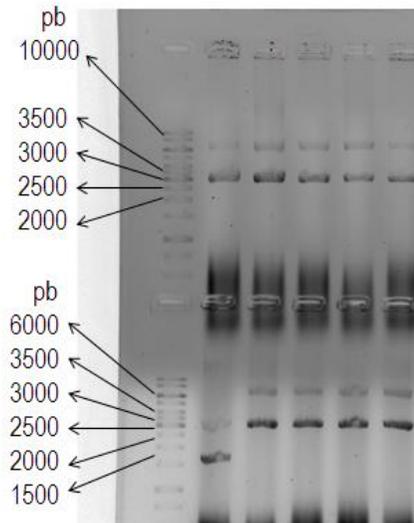


IMAGEN 3: Análisis de la transformación de *E. coli* con el DNA plasmídico del vector pJet para el gen *ACE2* de *S. schenckii*.

Se procedió entonces a digerir la muestra utilizando las enzimas Sac I y Pst I, luego se analizó mediante una electroforesis en gel. En la Imagen 4 se pudo evidenciar que se logró extraer el fragmento de DNA que contiene el casete de silenciamiento del vector de mantenimiento pJet, como se muestra en la Imagen 4.

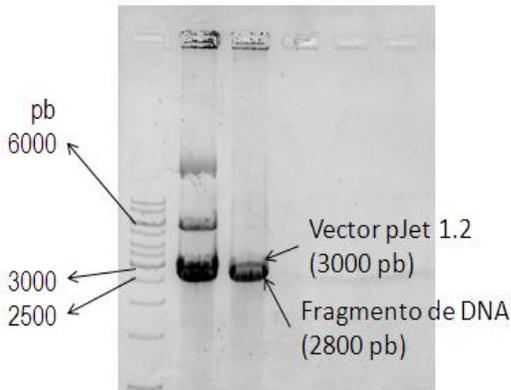


IMAGEN 4: Extracción del fragmento de DNA que contiene el casete de silenciamiento para el gen *ACE 2* de *S. Schenckii*.

Una vez realizada la purificación del gel de agarosa, se logró recuperar el fragmento de DNA que contiene el casete de silenciamiento para el gen *ACE 2*.

CONCLUSIONES

Se logró avanzar en la obtención de un casete de silenciamiento para el gen *ACE2* de *S. schenckii*.

Se pretende continuar trabajando con el fragmento de DNA obtenido en esta investigación, para lograr silenciar el gen *ACE2* en *S. Schenckii*, y poder establecer su papel dentro de la fisiología del hongo.

Este trabajo sirve como apoyo para futuros avances en la línea de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a M. en C. Luz Adriana López Ramírez (Universidad de Guanajuato) por su asistencia técnica. Este trabajo de investigación fue apoyado por la Universidad de Guanajuato.

REFERENCIAS

1. Michael T. Madigan, John M. Martinko, Paul V. Dunlap, David P. Clark (2009). Brock, Biología de los microorganismos (12th ed.). España. Pearson Education.
2. Teixeira PA, De Castro RA, Ferreira FR, Cunha MM, Torres AP, Penha CV, Rozental S, Lopes-Berreza LM: L-DOPA accessibility in cultura médium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. *Med Mycol: Offic Publ Int Soc Hum Anim Mycol* 2010, 48(5):678-695.
3. Zhang Y, Hagen , Stielow B, Rodrigues AM, Samerpitak K, Xun Z, Feng P, Yang L, Chen M, Deng S, Li S, Liao W, Li R, Li F, Meis JF, Guarro J, Teixeira MM, Al-Zahrani, Camargo ZP, Zhang L, Hoog S: Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* species with a pathogenic potential for mammals. *Persoonia*, in press.
4. Durán, A., Del Rey, F., Ribas, J., Rodríguez, C., Roncero, C., Sánchez, Y., Henar, M. Morfogénesis de microorganismos eucarióticos. Recuperado de http://www.geoscopio.com/est/gmms/imb/MORFOGENESIS_DE_MI_CROORGANISMOS_EUCARIOTICOS_119.htm.
5. Gisbert Doménech, Carmina. Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica. Recuperado de <https://riinet.upv.es/bitstream/handle/10251/11526/Microsoft%20Word%20%20art%C3%ADculo%20docente%20cgisbert%20sept2010.pdf?sequence=1>.
6. Kelly MT, et al. (2004) The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Mol Microbiol* 53(3):969-83
7. Avers, Charlotte J. (1991). *Biología celular* (2th ed.). California, Estados Unidos. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C.V. y/o Wadsworth International.