

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN *PMR1* DE *CANDIDA PARAPSILOSIS*

Leticia Guzmán Ruiz (1), María Navarro Arias, Nancy E. Lozoya Pérez, Héctor Manuel Mora Montes (2)

¹ [Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [lety.guzru@gmail.com]

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

Resumen

Los miembros del género *Candida* son un grupo de hongos patógenos oportunistas que se encuentran entre las causas más comunes de micosis en el mundo. Una de las especies de éste género es *C. parapsilosis*, que ha emergido como un agente importante de candidemia en varias regiones geográficas. Por ello es necesario conocer la interacción del hongo con su hospedero, y dado que la pared celular es el primer contacto, es importante conocer más acerca de ella. Este trabajo consiste en estudiar al gen *PMR1* de *C. parapsilosis*, para ello se aisló al gen, se clonó en el vector pJET1.2/blunt y se subclonó en el vector pYES2, un vector de clonación inducible para *Saccharomyces cerevisiae* que permite una selección por prototrofia de uracilo. En otras especies como *S. cerevisiae* y *Candida albicans*, se sabe que este codifica para una ATPasa de Ca^{2+}/Mn^{2+} y su ausencia tiene un efecto negativo en la glicosilación de las proteínas de la pared, donde las manosiltransferasas requieren del catión divalente Mn^{2+} para llevar a cabo su función. Hasta el momento no posible concluir nada acerca de este gen puesto que hacen falta diversos experimentos para finalizar el proyecto.

Abstract

The members of the genus *Candida* are a group of opportunistic fungal pathogen that are considered as the most common cause of mycosis in the world. One of the species of this genus is *C. parapsilosis* that has emerged as an important candidemia agent in several geographic regions. These reasons give us the necessity to know the interaction of this fungus with his host. The cell wall is the first contact point with the host and is important to know more about it. This work consists in the study of *C. parapsilosis* *PMR1*. We isolated the gene and cloned into pJET1.2/blunt. Then, *C. parapsilosis* *PMR1* was subcloned into pYES2, an inducible expression for *S. cerevisiae*. The vector allows easy cloning and transformant selection by uracil prototrophy. In other species, such as *S. cerevisiae* and *Candida albicans*, the absence of this gene had a negative effect on the cell wall protein glycosylation, causing increased sensitivity to stress and virulence attenuation. Since this is an ongoing project, we do not have conclusive evidence yet about the role of *PMR1* in *C. parapsilosis*.

Palabras Clave

Pared Celular; Glicosilación de proteínas; ATPasa Ca^{2+}/Mn^{2+} ; Manosiltransferasa

INTRODUCCIÓN

Desde 1980, los hongos han emergido como una de las mayores causas de enfermedades humanas, particularmente entre individuos inmunocomprometidos y pacientes hospitalizados, provocando serias condiciones subyacentes [1]. De las infecciones por hongos, la candidiasis invasiva es la más común en todo el mundo y *Candida albicans* sigue siendo la principal causa; sin embargo, la incidencia de especies *Candida* emergentes está incrementando [2]. Una de estas especies es *Candida parapsilosis*, que es conocida como la cuarta especie aislada más común en muestras de sangre de pacientes hospitalizados [3].

Candida parapsilosis

Las células de *C. parapsilosis* tienen forma de óvalo, circular o cilíndrica y en agar Sabouraud dextrosa forman colonias blancas, cremosas, brillantes, lisas o rugosas. Existen en forma de levadura o de pseudohifa, no forma verdaderas hifas y pueden diferenciarse por microscopía de luz. Las colonias de levadura, presentan fenotipo rugoso o de cráter; mientras que las de pseudohifa presentan fenotipo de crepe o concéntrico [4].

C. parapsilosis sensu stricto es un comensal del humano y es uno de los hongos más frecuentemente aislado del espacio subungueal en manos humanas. En datos de SENTRY Antimicrobial Surveillance Program del 2003 [2], *C. parapsilosis* fue la segunda especie más común de *Candida* aislada de sitios del cuerpo humano normalmente estériles de pacientes hospitalizados.

Una enfermedad invasiva causada por *C. parapsilosis* puede ocurrir sin una colonización anterior, es frecuentemente transmitida horizontalmente vía contaminantes externos como dispositivos o fluidos médicos, manos de cuidadores de la salud, dispositivos prostéticos y catéteres [2]. Además, la frecuencia de infección aumenta en individuos inmunocomprometidos, pacientes quirúrgicos (particularmente del tracto gastrointestinal) y pacientes que requieren uso prolongado de un catéter venoso central o dispositivos permanentes [2].

Pared celular

Para tener contacto con el hospedero, adherirse y provocar una infección es necesaria la pared celular. Esta ha sido ampliamente estudiada debido a la incidencia de éste hongo como patógeno. Los componentes principales de la pared celular en *C. albicans* son: un esqueleto de β 1,3-glucana que se une covalentemente a β 1,6-glucana y a quitina; además de una matriz formada por proteínas altamente glicosiladas [5,6,7].

La principal modificación post-traduccional que presentan las proteínas de pared celular es la glicosilación. Se entiende glicosilación como la adición subsecuente y procesiva de carbohidratos [8]. Se han caracterizado ampliamente dos rutas principales de glicosilación: la *N*- y *O*- glicosilación en *S. cerevisiae*; sin embargo, éstos son procesos ampliamente conservados con algunas diferencias que permiten al sistema inmune reconocerlos [6]; ambos procesos son esenciales para la viabilidad y virulencia de la célula [9].

Durante el proceso de *N*- y *O*-glicosilación en el lumen del aparato de Golgi son necesarias las manosiltransferasas que son responsables de la adición de carbohidratos [9,10,11,12]. Para llevar a cabo su función, las manosiltransferasas del aparato de Golgi necesitan: 1) algún donador de manosas y 2) iones Mn^{2+} como cofactores [11].

- Gen *PMR1*

Para obtener los iones de Mn^{2+} en una cantidad adecuada, es necesaria la ATPasa *Pmr1* que bombea iones Ca^{2+} / Mn^{2+} , ambos iones pueden ingresar ya sea de manera uniforme o ser reclutados selectivamente (o excluidos), y es codificada por el gen *PMR1* [11,12].

Para identificar algunos procesos que mantiene dicha bomba *Pmr1* se han llevado a cabo diversos experimentos con la mutante nula de dicho gen (*pmr1* Δ) y se compararon con el organismo silvestre de especies como *Saccharomyces cerevisiae* y *C. albicans*, entre otros.

En este trabajo se está estudiando al gen *PMR1* de *C. parapsilosis*, del cual se tiene información muy limitada a la fecha. Como ya se mencionó, en

otras especies como *S. cerevisiae* y *C. albicans*, se sabe que este codifica para una ATPasa de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ y su ausencia tiene un efecto negativo en la glicosilación de las proteínas de la pared, donde las manosiltransferas requieren del catión divalente Mn^{2+} para llevar a cabo su función. Esto les provoca un aumento en la sensibilidad a estrés y virulencia atenuada [11,12].

Para establecer si el gen *PMR1* de *C. parapsilosis* es un ortólogo funcional del mismo gen *PMR1* presente en *C. albicans* y *S. cerevisiae*, se aisló al gen de *C. parapsilosis* y se integró en el genoma de la mutante nula *S. cerevisiae pmr1Δ*. Esperamos que la mutante recupere el fenotipo silvestre, para comprobar que estos genes son ortólogos funcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un análisis *in silico* para buscar al gen ortólogo del *PMR1* de *C. albicans* en *C. parapsilosis* y se identificó a la secuencia con el número sistemático CPAR2_301360 como tal. A partir de dicha secuencia se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar al gen con los adaptadores para HindIII (señalado en rojo) y EcoRI (señalado en azul):

PMR1 D:

AAGCTTATGAGCAATCCCTATGATATAGATC

PMR1 R:

GAATTCAGTATGAGGTTTTAACATTAATAATCAT

Para amplificar dicho gen, se extrajo DNA genómico a partir de un cultivo de *C. parapsilosis* CLIB214 en medio YPD (Extracto de levadura 1%, dextrosa 2%, peptona gelatina 2%), incubado durante 16hrs a 28°C y con agitación a 200rpm. La extracción se realizó con un buffer de lisis (Tris-HCl 200mM, NaCl 250mM, EDTA 25mM, SDS 0.5%) seguido por un rompimiento mecánico utilizando perlas de vidrio y agitación. Finalmente se realizó una purificación con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).

A partir de éste se realizó una PCR empleando 2µg de DNA molde, 15nmol de cada oligonucleótido iniciador (PMR1 D y PMR1 R), 1u de enzima Platinum Pfx DNA polimerasa (Invitrogen), 1mM de MgSO_4 , 0.2mM de dNTPs y 1X de regulador, 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 68°C durante 7min.

Se realizó una electroforesis convencional en gel de agarosa al 1% y a partir de ésta se purificó al fragmento correspondiente al gen *PMR1* de *C. parapsilosis* con un tamaño de 2766pb empleando kit de purificación UltraClean® de MO BIO Laboratories, Inc [13].

Posteriormente se llevó a cabo la clonación y subclonación en donde el fragmento purificado se empleó como inserto para ligar con el vector pJET 1.2/blunt [14] y pYES2 [15] digerido con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI. Para la ligación con pJET1.2 se emplearon vector e inserto en una proporción 8:1 y para la de pYES2 4:1. En ambas reacciones se emplearon: 1µL de T4 ligasa, 2µL de Buffer de reacción 10X y se aforaron a 20µL con agua desionizada. La ligación con el vector pYES2 se dejó a 14°C durante 16hrs y con pJET1.2/blunt se dejó a temperatura ambiente por el mismo tiempo.

Con ambas construcciones se realizó una transformación con células competentes químicamente de *E. coli* DH5α y se espatuló en medio LB con carbenicilina para seleccionar a las células transformantes.

Se eligieron algunas colonias al azar y a partir de éstas se puso un cultivo en medio LB suplementado con carbenicilina que se dejó a 37°C durante toda la noche para extraer DNA plasmídico empleando el método de lisis alcalina [16].

El análisis de los DNA plasmídicos extraídos se llevó a cabo mediante digestión con enzimas de restricción; para analizar las clonas con la construcción pJET1.2/blunt + *CpPMR1* se llevó a cabo una digestión con la enzima BglII que libera al fragmento del vector, para ello se empleó 1u de enzima por cada 1µg de DNA y se dejó a 37°C durante 2hrs; para analizar las clonas con la construcción pYES2 + *CpPMR1* se llevó a cabo una doble digestión con las enzimas HindIII y EcoRI pues éstos fueron los sitios de ligación, para ello se empleó 1u de enzima HindIII por cada 1µg de DNA y se dejó a 37°C durante 2hrs, se purificó con solución PEG [17] y finalmente se realizó la segunda digestión del mismo modo que la primera pero empleando a la enzima EcoRI.

Para comprobar que se está trabajando con el gen *CpPMR1* se mandó secuenciar a CINESTAV en Irapuato al DNA plasmídico de la clona positiva para la construcción pJET1.2/blunt + *CpPMR1*, en

este lugar emplean el método de secuenciación Sanger [18].

Luego de comprobar las construcciones, se realizó una transformación empleando el método de acetato con acetato de Litio [19] y una mutante de *S. cerevisiae* que presenta una disrupción en el gen *PMR1*, para ello se empleó la construcción pYES2 + *CpPMR1*. Al final se espatuló en medio mínimo SC para seleccionar las células que perdieron la auxotrofia a uracilo.

Finalmente, se realizaron algunas pruebas preliminares con pequeñas modificaciones al ensayo de unión al colorante azul alciano [11], para determinar si existe la complementación del gen. Para éstos ensayos es necesario emplear medio mínimo YNB (Base nitrogenada de levadura con sulfato de amonio con aminoácidos 0.67% p/v, galactosa 3% p/v y rafinosa al 7.5% p/v) para inducir la transcripción del gen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se amplificó al gen *PMR1* de *C. parapsilosis* (Figura 1) y éste se empleó para clonar y subclonar en los vectores pJET 1.2/blunt [14] y pYES2 [15].

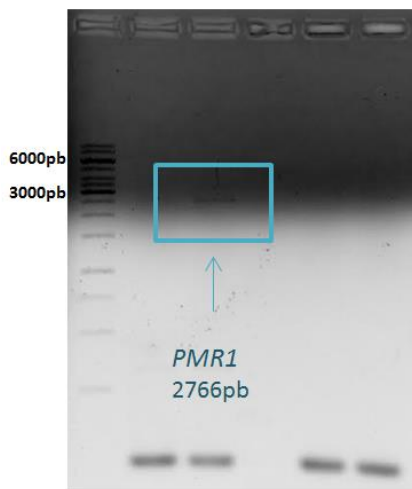


FIGURA 1: Amplificación del gen *PMR1*

Para analizar si las clonas que se obtuvieron eran positivas para la construcción pJET1.2/blunt + *CpPMR1* se realizó una digestión con la enzima BglIII (Figura 2) y para la construcción pYES2 + *CpPMR1* se llevó a cabo una doble digestión con las enzimas HindIII y EcoRI (Figura 3), ambos

patrones fueron los establecidos en el mapa de restricción, por lo que se tienen las 2 clonas positivas en pJET1.2 y pYES2.

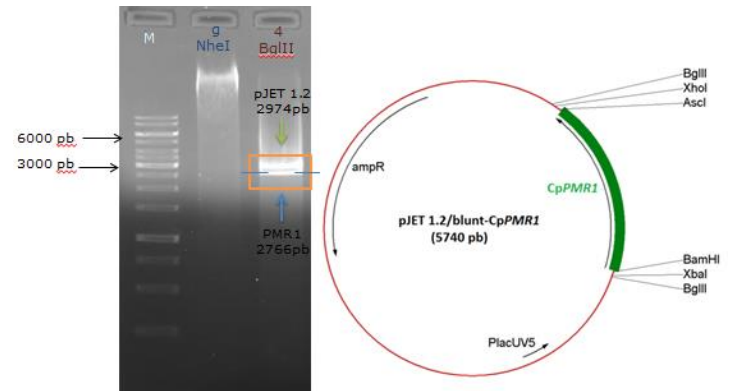


FIGURA 2: Digestión de la construcción pJET1.2/blunt-*PMR1*

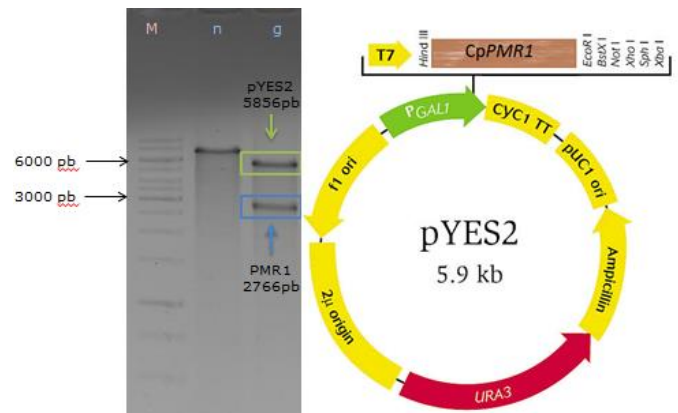


FIGURA 3: Digestión de la construcción pYES2-*PMR1*

Además, con la secuenciación se pudo observar que la secuencia es idéntica hasta la 927 pb, después de ahí hay algunas discrepancias en bases, sin embargo, no se descarta error de secuenciación, por lo que se diseñará un oligonucleótido para terminar de secuenciar.

Finalmente, después de la transformación de la mutante en *PMR1* de *S. cerevisiae* se realizaron ensayos macroscópicos que sugieren la complementación del gen. El colorante catiónico azul alciano tiene afinidad hacia la carga negativa que presentan las fosfomananas, por lo que es una prueba indirecta de la N-glicosilación. Sin embargo, son necesarios los ensayos finos para determinar que la mutante presenta una severa reducción al colorante y que las transformantes recuperan el fenotipo silvestre.

CONCLUSIONES

Hasta el momento no se puede concluir que el gen *PMR1* de *C. parapsilosis* es un ortólogo funcional del mismo en *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Es necesario llevar a cabo la comprobación por PCR de las transformantes en *S. cerevisiae*, terminar de secuenciar el gen y enseguida realizar un análisis fenotípico de la cepa *Scp_{pmr1}Δ+Cp_{PMR1}* para así tener evidencia clara de la función de dicho gen.

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros del laboratorio de glicobiología por sus sugerencias y guía durante el desarrollo de este trabajo, especialmente a María Navarro, Roberto González, Nancy López y Adriana López con quienes trabajé directamente y me tuvieron mucha paciencia durante el proceso. Este trabajo es apoyado por el CONACyT (CB2011-166860) y la Universidad de Guanajuato.

REFERENCIAS

- [1] Pfaller, M. A. & Diekema D. J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Rev*, 20(1), pp. 133-163. doi: 10.1128/CMR.00029-06
- [2] Trofa, D., Gácsér, A. & Nosanchuk J. D. (2008) *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Rev*, 21(4), pp. 606-625. doi: 10.1128/CMR.00013-08
- [3] Jain, M., Dogra, V., Mishra, B., Thakur, A., Loomba, P. S. & Bhargava, A. (2011) *Candiduria* in catheterized intensive care unit patients: emerging microbiological trends. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 54(3), pp. 552-555. doi: 10.4103/0377-4929.85091
- [4] Laffey, S.F. & Butler, G. (2005). Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 151(Pt 4), pp. 1073-1081. doi: 10.1099/mic.0.27739-0
- [5] Chaffin, W. L. (2008). *Candida albicans* Cell Wall Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(34), pp. 495-544. doi: 10.1128/MMBR.00032-07
- [6] Mora Montes, H. M., Pérez García, L. A. (2013). La pared celular de *Candida albicans*: Estructura, organización e importancia fisiológica. Saarbrücken, Deutschland/Alemania. Editorial Académica Española.
- [7] Perez García, L. A., Díaz Jimenez, D., Lopez Esparza, A. & Mora Montes, H. M. (2011). Role of Cell Wall Polysaccharides during Recognition of *Candida albicans* by the Innate Immune System. *Journal of Glycobiology*, 1(1):102. doi: 10.4172/jbg.1000102
- [8] Lodish, H., Berk, A. & Zipursky, S.L. (2000) Protein Glycosylation in the ER and Golgi Complex. W. H. Freeman. (4th ed.), Molecular Cell Biology. New York: Section 17.7, Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21744/>
- [9] Mora Montes, H. M., Ponce Noyola P. P., Villagómez Castro J. C., Grow N. A., Flores Carreón A. & López Romero E. (2009). Protein glycosylation in *Candida*. *Future Microbiology*, 4(9), pp. 1167-1183. doi: 10.2217/fmb.09.88
- [10] Munro, C. A., Bates, S., Buurman, E. T., Hughes, B. H., MacCallum, D. M., Bertram, G., Atrih, A., Ferguson, M. A. J., Bain, J. M., Brand, A., Hamilton, S., Westwater, C., Thomson, L. M., Brown, A. J. P., Odds, F. C. & Neil A. R. Gow, N. A. R. (2005). Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant α -1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), pp.1051-1060. doi: 10.1074/jbc.M411413200
- [11] Bates, S., MacCallum, D. M., Bertram G., Munro C. A., Hughes, H. B., Buurman, E. T., Brown A. J. P., Odds F. C. & Gow N. A. R. (2005). *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, is required for glycosylation and virulence. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(24), pp. 23408-23415. doi:10.1074/jbc.M502162200
- [12] Durr G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S. K., Catty, P., Wolf, D. H. & Rudolph, H. K. (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. *Molecular Biology of the Cell*, 9, pp. 1149-1162. PMID: PMC25337
- [13] MO BIO Laboratories, Inc. Ultra clean®, Gelspin®, DNA extraction kit. Consultado: 28 de julio de 2015. Recuperado de: <http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/12400.pdf>
- [14] Thermo Fisher Scientific. CloneJET PCR Cloning Kit. Consultado: 28 de julio de 2015. Recuperado de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231>
- [15] Thermo Fisher Scientific. pYES2 Yeast Expression Vector. Consultado: 28 de julio de 2015. Recuperado de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V82520>
- [16] Galván-Cedujó, A., Tejada, M., Camargo, A., Higuera, J. J., Mariscal, V. & Fernández-Reyes, E. 39. Aislamiento y purificación del DNA de un plásmido recombinante. Consultado: 6 de agosto de 2015. Recuperado de: www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/39_AISLAMIENTO_Y_PURIFICACION_DEL_DNA_DE_UN_PLASMIDO_RECOMBINANTE.pdf
- [17] EpicentreBio. MasterPure™ DNA purification kit. Consultado: 8 de Agosto de 2015. Recuperado de: <http://www.researchgate.net/publications/PublicPostFileLoader.html?id=54b6f279d039b1792c8b45ea&key=e52d9e76-cc5f-4022-904c-1489e6f97e34>
- [18] Obenrader, S. The Sanger Method. Consultado: 13 de Agosto de 2015. Recuperado de: http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Obenrader/sanger_method_page.htm
- [19] MClean Lab Protocol Princeton. (2010). Yeast Transformation. Consultado: 13 de agosto de 2015. Recuperado desde: <http://www.princeton.edu/genomics/mcclean/protocols/Yeast-Transformation.pdf>