

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

Juárez Palacios, Jesús Emmanuel (1), García-Carnero, Laura Cristina (2); Lozoya-Pérez, Nancy Edith (3); García-Gutierrez, Karina (4), Mora-Montes, Héctor Manuel (5)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: je.juarezpalacios@ugto.mx

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: laura_cgc@hotmail.com

3 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: nelppat@hotmail.com

4 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: karina.kg@gmail.com

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

Resumen

Los miembros de las especies de *Sporothrix* son hongos patógenos asociados con la esporotricosis, una enfermedad subcutánea de humanos y animales. La infección está mediada por inoculación por traumatismos de elementos fúngicos en tejidos cutáneos/subcutáneos, y ocasionalmente por inhalación de estructuras fúngicas. Estos hongos son dimórficos, exhibiendo una forma de levadura invasiva en el huésped. Ambas morfologías de *S. schenckii* tienen la capacidad de sintetizar melanina. Enzimas como las policétido sintasas tipo III (PKS) son piezas clave en la síntesis temprana de este pigmento, este es un compuesto insoluble altamente relacionado con la virulencia en varios hongos.

Abstract

Members of *Sporothrix* species are fungal pathogens associated with sporotrichosis, a subcutaneous disease of humans and animals. The infection is mediated by the traumatic inoculation of fungal elements into the cutaneous/subcutaneous tissues or, occasionally, by inhalation followed by pulmonary lesions. The fungi are dimorphic, exhibiting an invasive yeast-like form in the host. Both morphologies of *S. schenckii* can synthesize melanin. Enzymes such as type III polyketide synthase (PKS) are key pieces in the early synthesis of this pigment, this is an insoluble compound highly related to virulence in several fungi.

PALABRAS CLAVE

Esporotricosis; Policétido sintasa tipo III; Melanina; Expresión; Silenciamiento génico

INTRODUCCIÓN

La esporotricosis, causada por el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*, está actualmente distribuida por el mundo, especialmente en zonas tropicales y subtropicales [1]. Es causada por la inoculación traumática del hongo existente en materia orgánica y los suelos, por astillas de madera de algunos árboles y recientemente se ha descrito por contacto o rasguños por gatos y ocasionalmente puede ser inhalado o llegar a la conjuntiva. Las personas inmunodeprimidas suelen sufrir lesiones extensas y múltiples. Las poblaciones más vulnerables son campesinos, amas de casa y menores de 15 años [2]. Este hongo es dimórfico, viviendo como saprófito en asociación con restos de plantas y materia orgánica en descomposición del suelo de forma micelial y exhibiendo una forma de levadura invasiva en el huésped [3].

Además del dimorfismo, el conocimiento actual sobre los factores de virulencia de *Sporothrix* sigue siendo escaso. La superficie celular de los hongos patógenos juega un papel clave en la interacción huésped-hongo, mediando varios procesos asociados con la patogénesis. Hasta el momento, se han identificado pocas proteínas y glicoconjugados en la pared celular de *S. schenckii*. Otro factor de virulencia de la pared celular es la melanina, se encontró en conidios y levaduras de *S. schenckii* que se produjeron *in vitro* o *in vivo* durante la infección. Los pigmentos de melanina protegen al hongo de la respuesta inmune innata del huésped mamífero y proporcionan resistencia a los agentes oxidantes y la muerte de las células fúngicas durante la fagocitosis [4].

Policétido sintasa tipo III

Los policétidos comprenden diversos metabolitos secundarios fúngicos, como antibióticos, pigmentos y micotoxinas que se forman a partir de ácidos precursores de carbono simples catalizados por policétidos sintasas (PKS). Las PKS se dividen en tres grupos según sus secuencias, estructuras primarias y mecanismos catalíticos, incluidos los tipos I, II y III. Las PKS tipo III son ampliamente estudiadas en plantas y bacterias, su presencia en hongos solo se ha realizado en los últimos años, como resultado de algunos proyectos de secuenciación del genoma fúngico [5]. Las PKS fúngicas son, en general, una sucesión lineal de varios dominios catalíticos. El linaje de *Sporothrix* parece tener genes que codifican PKS que es al menos 3 veces más grande que el de otras especies de hongos [4].

Síntesis de Melanina de *S. schenckii*

La comparación genómica ha mostrado que tanto *S. schenckii* como *S. brasiliensis* poseen enzimas con funciones centrales en la síntesis de melanina a través de las rutas DHN y DOPA, y también en la síntesis de piomelanina, dentro de las cuales, la que se produce a partir de 1,8-dihidroxi-naftaleno (1,8-DHN) es la más estudiada, y da lugar al tipo DHN-melanina [4]. La homología con las enzimas relacionadas con la síntesis de melanina previamente descritas que se encuentran en los análisis de secuencia son: proteína de biosíntesis de pigmento yellowish-green 1, policétido sintasas tipo I y III, tetrahidroxi-naftaleno / trihidroxi-naftaleno reductasa, esctalona deshidratasa, lacasa, tirosinasa y 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa [4].

Ambas etapas morfológicas de *S. schenckii* tienen la capacidad de sintetizar melanina. Este es un compuesto insoluble altamente relacionado con la virulencia en varios hongos. La producción de melanina en los conidios dematiáceos de *S. schenckii* ocurre a través de la vía del pentacétido 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN). Macroscópicamente, solo la fase micelial del hongo está melanizada. Sin embargo, la producción de melanina en células de levadura se ha demostrado *in vitro* durante la infección [1].

MATERIALES Y MÉTODOS

Crecimiento y mantenimiento de microorganismos. Los cultivos de *Escherichia coli* DH5 α y BL21 se incubaron a 37°C, en medio líquido LB suplementado con ampicilina con agitación 120 rpm. Los stocks se mantuvieron en glicerol al 50% con el medio de cultivo suplementado con ampicilina a -70°C

Extracción de DNA plasmídico (pDNA). El medio dónde se inoculó la bacteria se centrifugó hasta formar una pastilla, se resuspendió en sobrenadante, se agregó solución TENS (Tris-EDTA-NaOH-SDS), se incubaron temperatura ambiente y se adicionó acetato de sodio, se centrifugó para empastillar, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y el DNA plasmídico se precipita con etanol al 100% (-20°C), se lava 2 veces con etanol al 70% (-20°C).

PCR. Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa se requirió de: pDNA aislado, oligonucleótidos iniciadores específicos (reverso y directo), amortiguador 10X DreamTaq (MgCl₂ 20mM), desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y enzima DreamTaq.

Electroforesis de ácidos nucleicos. La separación de los ácidos nucleicos se realizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa empleando para la detección bromuro de etidio y TAE 1X como amortiguador.

Clonación en pCold, pJet 1.2 blunt y pSilent. Se realizó restricción con las enzimas correspondientes para linealizar los vectores y se ligaron los fragmentos purificados de DNA utilizando T4 ligasa; pCold y pSilent toda la noche (16°C), pJet 1.2 blunt toda la noche (temperatura ambiente)

Transformación de *E. coli*. Las células químicamente competentes de *E. coli* se transformaron agregando la ligación del fragmento en el vector correspondiente o plasmido purificado y se les dio un choque térmico a 42°C, se colocaron en hielo y posteriormente a una recuperación de 1 hora a 37 °C en medio LB. Las placas se inocularon y se incubaron 24 horas a 37°C para observar transformantes.

Inducción de *E. coli* BL21 para sobreexpresión. Se deja un preinóculo toda la noche y al día siguiente se inoculan 500 µL del preinóculo en 25 µL de LB ampicilina hasta D.O. 0.5 – 0.8 a 37°C, después se adiciona isopropil-tio-β-galactosido (IPTG) para controlar la expresión y se incubó de 15 - 20°C por 24 horas.

Electroforesis de proteínas. La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida, empleando para detección el colorante Azul de Coomassie.

Purificación de fragmentos de ácidos nucleicos en gel de agarosa. Se utilizó el kit de purificación de ácidos nucleicos GeneJET, utilizando buffers para fundir el gel de agarosa y una columna para separar los ácidos nucleicos y se resuspende en Elution Buffer.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expresión de forma heteróloga de una PKS III de *S. schenckii* en *E. coli*:

Se extrajo pDNA de las colonias crecidas de las células transformadas con la clonación del fragmento de la PKS III en pCold en *E. coli* DH5α y se comprobó la presencia del fragmento mediante PCR usando oligonucleótidos de PKS III que amplifican el gen de 1323 pb (IMAGEN 1). Se seleccionó el pDNA de la clona número 6 para transformar células químicamente competentes de *E. coli* DH5α para guardar en stock y *E. coli* BL21 para comenzar la inducción para la expresión de la PKS III en esta bacteria.

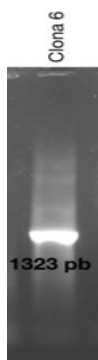


IMAGEN 1: Producto de amplificación de PCR de la PKS III en DNA plasmídico de las clonas transformadas con pCold + PKS III de *E. coli*, se observó una banda de 1323 pb en las clonas 6, 13 y 16 y en DNA genómico de *S. schenckii*, sólo se muestra la clona 6.

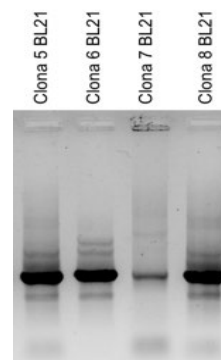
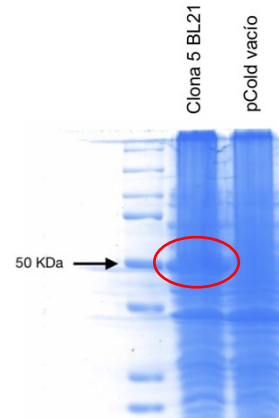


IMAGEN 2: Productos de amplificación de la PCR de la construcción de PKS III en pCold con pDNA de clonas de *E. coli* BL21 para comenzar sobreexpresión de la proteína, se obtuvo una banda de 1458 pb, sólo se muestran 4 clonas, las otras tuvieron el mismo comportamiento.

Se obtuvieron 8 clonas posibles de *E. coli* BL21 que se comprobaron con PCR utilizando el oligonucleótido directo de pCold y el reverso de PKS III para comprobar que el fragmento se encontrara dentro del vector, mostrando una banda de 1458 pb (1323 pb de PKS III + 135 pb del fragmento del vector) se seleccionaron: 5, 6, 7 y 8 para la sobreexpresión (IMAGEN 2). Después de la inducción de *E. coli* BL21 se corrió un concentrado de células bacterianas lisadas con el buffer de carga para gel de poliacrilamida y se realizó la electroforesis de proteínas para observar la sobreexpresión de la PKS III, se observó en las 4 clonas seleccionadas y se utilizó como control negativo células transformadas con el vector vacío pCold. El peso teórico de la proteína es de 46 825 Da sin tomar en cuenta las colas de histidina de la síntesis proteica, por lo que se observa cerca de los 50 KDa (IMAGEN 3). Ahora se planea purificar esta proteína y medir su actividad.

IMAGEN 3: Gel de poliacrilamida donde se corrió el concentrado celular de la inducción de *E. coli* BL21 para observar la sobreexpresión de la PKS III en una cepa bacteriana. Se observa la proteína cerca de los 50KDa en la clona 5, se observó el mismo comportamiento en las otras 3 clonas seleccionadas.



Elaborar un casete molecular para el silenciamiento del gen que codifica a la PKS III de *S. schenckii*.

Se diseñaron oligonucleótidos para el silenciamiento del gen de la PKS III, dos de sentido y dos de antisentido tomando en cuenta secuencias de enzimas de restricción para librería el fragmento posteriormente y poder clonarlo en otros vectores. Se amplificaron los fragmentos de sentido y antisentido por PCR utilizando cDNA obtenido del RNA de micelio de *S. schenckii* (IMAGEN 4), se ligaron en pJet 1.2 blunt y se transformó *E. coli* DH5 α , se extrajo pDNA de 8 clonas de sentido y 8 de antisentido y se comprobaron las positivas por PCR, se obtuvieron tres clonas positivas para el fragmento de sentido (clonas 1, 3 y 6) y tres para antisentido (clonas 2, 3 y 7) (IMAGEN 5). Después se extrajo el fragmento de sentido por restricción del pDNA de la clona 3 y se ligó en pSilent, se transformaron células de *E. coli* DH5 α y se extrajo pDNA de 6 colonias, se comprobó el fragmento utilizando oligos internos de pSilent esperando una banda de 574 pb para el vector vacío y de 864 pb para el vector con el fragmento de sentido, posteriormente se confirmó la presencia de éste fragmento en el vector con una digestión del producto de la PCR usando Hind III, ésta cortó dos fragmentos para el vector vacío de 297 pb cada uno y dos fragmentos, uno de 549 pb y 297 pb, para las clonas con el sentido (IMAGEN 6), con lo anterior se confirmó la construcción del sentido en pSilent para así posteriormente poder ligar el antisentido.

IMAGEN 4: Productos de amplificación del fragmento de sentido y antisentido de 280 pb para ligar en pJet 1.2 blunt.

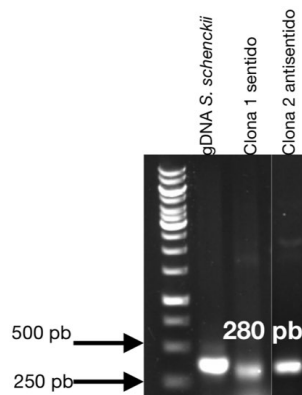
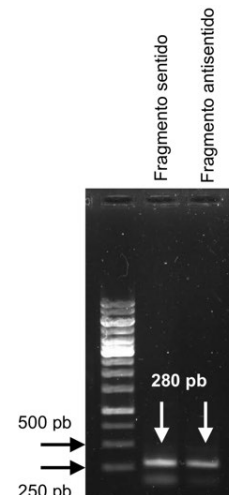


IMAGEN 5: Clonas positivas por PCR del fragmento de sentido y antisentido en pJet 1.2 blunt para digerir y clonar en pSilent, sólo se muestran las clonas 1 de sentido y 2 de antisentido, las otras clonas mencionadas en el texto mostraron la misma banda de 280 pb.

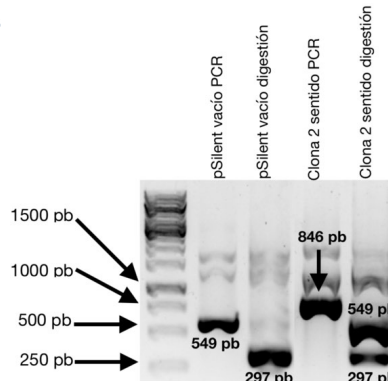


IMAGEN 6: Productos de PCR y de digestion con Hind III de la transformación de *E. coli* DH5 α con el fragmento de sentido de la clona 3 ligado en pSilent. Se observaron 4 clonas positivas, Sólo se muestra la clona 2.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron al menos cuatro clones de *E. coli* BL21 que expresan la proteína PKS III y otras cuatro que contienen la construcción para la expresión comprobada por PCR, se purificará más adelante esta proteína y se medirá la actividad.

Se logró obtener la construcción en sentido del casete de silenciamiento para la PKS III, se seguirá trabajando para obtener la construcción completa y clonar en *Agrobacterium tumefaciens* para transformar *S. schenckii* y lograr el silenciamiento del gen para conocer su participación en procesos biosintéticos del hongo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los miembros del Laboratorio de Glicobiología de Hongos del Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas, especialmente a Karina y Laura que siempre me estuvieron ayudando y asesorando y haciendo más amena la estancia, a Nancy que desde enero me instruyó en sus técnicas y me brindó asesorías durante el desarrollo de este proyecto. Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (ref. PDCPN2014-247109, yFC 2015-02-834), Universidad de Guanajuato (ref. 1025/2016; CIIC 95/2018), y Red Temática Glicociencia en Salud (CONACYT-México).

REFERENCIAS

- [1] Barros, M. B. de L., de Almeida Paes, R., & Schubach, A. O. (2011). *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 633–654. <http://doi.org/10.1128/CMR.00007-11>
- [2] Teixeira, M. de M., Rodrigues, A. M., Tsui, C. K. M., de Almeida, L. G. P., Van Diepeningen, A. D., van den Ende, B. G., Felipe, M. S. S. (2015). Asexual Propagation of a Virulent Clone Complex in a Human and Feline Outbreak of Sporotrichosis. *Eukaryotic Cell*, 14(2), 158–169. <http://doi.org/10.1128/EC.00153-14>
- [3] Lozoya Pérez, N. E. (2018) Relevancia de la N-glicosilación en la virulencia y reconocimiento inmune de *Sporothrix schenckii* (tesis de doctorado). Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Guanajuato, Guanajuato, México.
- [4] Teixeira, Marcus M. and de Almeida, Luiz GP and Kubitschek-Barreira, Paula and Alves, Fernanda L. and Kioshima, Érika S. and Abadio, Ana KR and Fernandes, Larissa and Derengowski, Lorena S. and Ferreira, Karen S. and Souza, Rangel C. and Ruiz, Jeronimo C. and de Andrade, Nathalia C. and Paes, Hugo C. and Nicola, André M. and Albuquerque, Patrícia and Gerber, Alexandra L. and Martins, Vicente P. and Peconick, Luisa DF and Neto, Alan Viggiano and Chaucanez, Claudia B. and Silva, Patrícia A. and Cunha, Oberdan L. and de Oliveira, Fabiana FM and dos Santos, Tayná C. and Barros, Amanda LN and Soares, Marco A. and de Oliveira, Luciana M. and Marini, Marjorie M. and Villalobos-Duno, Héctor and Cunha, Marcel ML and de Hoog, Sybren and da Silveira, José F. and Henrissat, Bernard and Niño-Vega, Gustavo A. and Cisalpino, Patrícia S. and Mora-Montes, Héctor M. and Almeida, Sandro R. and Stajich, Jason E. and Lopes-Bezerra, Leila M. and Vasconcelos, Ana TR and Felipe, Maria SS. (2014). Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *BMC Genomics*, 15(1), 943. Doi 10.1186/1471-2164-15-943
- [5] Yu, D. , Xu, F. , Zeng, J. and Zhan, J. (2012), Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. *IUBMB Life*, 64: 285-295. doi:10.1002/iub.1005