

ANÁLISIS FUNCIONAL DE GENES QUE PARTICIPAN EN LA ELABORACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS EN *SPOROTHRIX SCHENCKII*

Ortiz Alvarado, Irving Josué (1), López-Ramírez, Luz Adriana (2), Mora-Montes, Héctor Manuel (3)

- 1 [Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [josuecool93@gmail.com]
2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [adrianalr@ugto.mx]
3 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [hmora@ugto.mx]

Resumen

El género *Sporothrix* abarca un gran número de especies fúngicas, dentro de las cuales algunas que pueden causar enfermedades en animales y el hombre. Una de las especies patógenas de este género es *Sporothrix schenckii*, la cual se ha asociado de forma clásica con la esporotricosis humana, tanto subcutánea como sistémica. Para poder generar estrategias de control de este organismo, es necesario entender su interacción con los diferentes tejidos y órganos del hospedero. En este trabajo estamos interesados en estudiar el papel funcional del gen *ACE2* de *S. schenckii*, el cual en otros sistemas se ha reportado como un regulador de la formación de la pared celular, un organelo esencial durante el contacto con el hospedero. Mediante PCR se aisló el gen de interés, se clonó en el vector pSilent, y se subclonó en el plásmido pBgGHg. Dicha construcción servirá para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens*, las cuales a su vez permitirán la transformación de *S. schenckii* y, mediante silenciamiento génico, podremos analizar la relevancia biológica de *ACE2* en *S. schenckii*.

Abstract

The genus *Sporothrix* includes a large number of fungal species, among which some can cause diseases in animals and humans. One of the pathogenic species of this genus is *Sporothrix schenckii*, which has been classically associated with both subcutaneous and systemic human sporotrichosis. To generate strategies to control this organism, it is necessary to understand its interaction with different tissues and organs from the host. In this work we are interested in studying the functional role of *S. schenckii* *ACE2* that in other systems has been reported as a regulator of the cell wall formation, an essential organelle during contact with the host. By PCR the gene of interest was isolated, cloned into the vector pSilent, and subcloned into the plasmid pBgGHg. Such construction will serve to transform *Agrobacterium tumefaciens* cells, which in turn will allow transformation of *S. schenckii* and, through gene silencing, we will be capable to analyze the biological relevance of *ACE2* in *S. schenckii*.

INTRODUCCIÓN

Los agentes etiológicos de la esporotricosis forman parte del complejo *Sporothrix schenckii*. Las especies descritas, caracterizadas principalmente por procedimientos genéticos y que forman parte del complejo son: *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* y *S. schenckii*; sin embargo, en los estudios realizados, y en particular en México, la especie predominante es *S. schenckii*. Esta especie corresponde a un hongo dimórfico que se presenta en la naturaleza en forma micelial (o fase infectiva); y cuando un hospedero es infectado el microorganismo desarrolla la forma de levadura (o fase parasitaria). [1]

Sporothrix schenckii

Morfología macroscópica en fase micelial: colonia de crecimiento rápido, de aspecto membranoso, frecuentemente con pliegues radiales, inicialmente de color blanco o beige, que con el tiempo tiende a pigmentarse.

Morfología microscópica en la fase micelial (infectiva): hifas finas (1- 3 μm de diámetro), ramificadas, hialinas, septadas con conidióforos de 10 - 30 μm de largo, de las que nacen conidios ovoides o piriformes dispuestos en forma de "pétalos de margarita o flor de durazno" (simpoduloconidios); algunos conidios nacen directamente del tallo de la hifa (raduloconidios) de 3 - 5 micras. Los conidios de forma triangular se presentan generalmente en los cultivos pigmentados. [1]

La esporotricosis se distribuye actualmente en todo el mundo, especialmente en las zonas tropicales y subtropicales. La infección se produce generalmente por inoculación traumática de suelo, las plantas, y la materia orgánica contaminada con el hongo. Ciertas actividades de ocio y ocupacionales, como la floricultura, agricultura, la minería y la explotación de madera, están asociados tradicionalmente con la micosis. [2]

Pared celular

Las proteínas de la pared celular, localizadas en la superficie celular, inducen respuestas de inmunidad celular y humoral, y son candidatas potenciales tanto para objetivos diagnósticos como para la generación de vacunas en la prevención de las infecciones fúngicas. [3]

Gen ACE2

Factor de transcripción; similar a *S. cerevisiae* Ace2 y Swi5; regula la morfogénesis, la separación de células, la adhesión, la virulencia en ratones, núcleo promotor región proximal de unión a ADN específica de secuencia, la actividad del factor de transcripción, ARN polimerasa II núcleo promotor región proximal secuencia específica de unión de zinc.[4]

Con esto se planteó examinar la actividad del gen ACE2 en *S. schenckii*, para poder hacer esto se pretende silenciar el gen, ya con el gen silenciado dentro del genoma de *S. schenckii* poder analizar su fenotipo que presente, pudiendo comparar con los ya descritos en *S. cerevisiae* Ace2 y Swi5, así observar una actividad similar.

MATERIALES Y MÉTODOS

El gen ACE2 de *S. schenckii* se amplificó mediante PCR por el grupo de trabajo en un trabajo previo. El fragmento de DNA de interés se purificó con una electroforesis convencional en gel de agarosa al 1% y empleando kit de purificación UltraClean® de MO BIO Laboratories, Inc [5], se empleó como inserto para ser ligado el vector pJET 1.2/blunt [6]. Para la ligación con pJET1.2 se se empleó: 1 μL de T4 ligasa, 2 μL de Buffer de reacción 10X y se aforó a 20 μL con agua desionizada. La ligación con pJET1.2/blunt se dejó a 28 °C por 18 horas. Posteriormente, se realizó una transformación con células competentes químicamente de *Escherichia coli* DH5 α y se espatuló en medio LB con Ampicilina 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 ampicilina, que se dejó a 37°C durante toda la noche para extraer DNA plasmídico empleando el método de lisis alcalina [7]. 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 + SsACE2 se llevó a cabo una digestión con la enzima Bgl II que libera al inserto del vector, para ello se empleó 1u de enzima por cada 1µg de DNA y se dejó a 37°C durante 3hrs. Dando positiva la digestión con Bgl II se llevó a cabo una doble digestión con las enzimas Sac I y Pst I, para ello se empleó 1u de enzima SacI por cada 1µg de DNA y se dejó a 37°C durante 3hrs, se purificó con solución PEG [8] y finalmente se realizó la segunda digestión del mismo modo que la primera pero empleando a la enzima Pst I.

Se realizó una electroforesis convencional en gel de agarosa al 1% y a partir de ésta se purificó al fragmento correspondiente al gen *ACE2* de *S. schenckii*, con un tamaño aproximado de 2764pb, empleando kit de purificación UltraClean® de MO BIO Laboratories, Inc [5].

Otra vez se llevó a cabo la clonación en donde el fragmento purificado se empleó como inserto para ligar con el vector pBgGHg, se realizó una transformación con células competentes químicamente de *E. coli* DH5α y se espatuló en medio LB con kanamicina esta vez 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 Kanamicina que se dejó a 37°C durante toda la noche para extraer DNA plasmídico empleando el método de lisis alcalina [6].

A partir de éste se realizó una PCR empleando 0.5µl de DNA molde, 1.5µL de cada oligonucleótido iniciador, 1 µL de enzima Taq. DNA polimerasa (Invitrogen), 1mM de MgCl₂, 1µL de dNTPs, 2.5µL de buffer y con agua desionizada se llevó a 24µL, 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 esto por 30 ciclos.

Después de esto se esperó transformar *A. tumefaciens* pero no se logró comprobar la transformación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para analizar si las clonas que se obtuvieron eran positivas para la construcción pJET1.2/blunt +

SsACE2 se realizó una digestión con la enzima BglII (Figura 1).

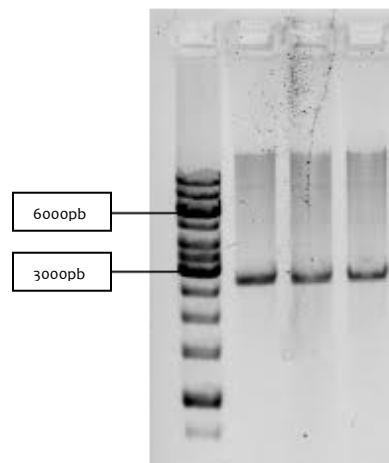


Figura 1: Digestión de la construcción de pJET 1.2/blunt-ACE2 donde se observa la banda de 2800 pb que confirman la transformación.

Al término, y para poder purificar y hacer la ligación se realizó una digestión con las enzimas SacI y PstI (Figura 2).



Figura 2: Digestión de la construcción de pJET 1.2/blunt-ACE2

Al obtener estas bandas, la banda de arriba que era la de nuestro interés (2764 pb), se purificó para realizar una ligación al vector pBgGHg y, una vez generada la construcción y haber transformado células de *E. coli* DH5α, el DNA plasmídico se extrajo y se utilizó para hacer una

reacción de PCR, con el fin de verificar la identidad de la construcción (Figura 3).

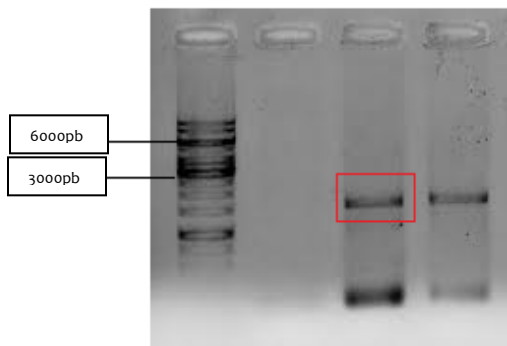


Figura 3: PCR de la transformato en el vector pBgGhg, buscando una banda de 1700 pb.

Con esto ya se pudo poner una transformación de *A. tumefaciens* para después así transformar a *S. schenckii*, lo cual se realizó, pero no se pudo caracterizar las mutantes generadas.

CONCLUSIONES

Hasta este punto no podemos concluir el efecto del silenciamiento del gen *ACE2* en *S. schenckii*, ya que hasta este momento se llegó a transformar *Agrobacterium tumefaciens* y las transformantes generadas deberán de ser comprobadas antes de iniciar la transformación de células de *S. schenckii*.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis compañeros del laboratorio de Glicobiología de Hongos por su apoyo, sus consejos y su guía para poder desarrollar este trabajo, en especial a Patricia Álvarez, Nancy Lozoya y Adriana López, con quienes trabajé directamente y me tuvieron mucha paciencia en cada momento. Este trabajo fue apoyado por CONACyT, México (PDCPN2014-247109) y Universidad de Guanajuato.

REFERENCIAS

- [1] Francisca Hernández Hernández Unidad de Micología, Micología Médica Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Medicina, UNAM. Consultado 19 de julio del 2016. Recuperado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/esporotricosis.html>
- [2] Mónica Bastos de Lima Barros, Rodrigo Paes de Almeida ,(2011) *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis, American Society Of Microbiology, Volume 29, Issue 4, p.p. 633-654, doi: 10.1128/CMR.00007-11.
- [3] Carlos A. Alba-Fierro, Armando Pérez-Torres, Everardo López-Romero, Mayra Cuéllar-Cruz, Estela Ruiz-Baca (2014) Cell wall proteins of *Sporothrix schenckii* as immunoprotective agents, ELSEVIER, Volumen 31, p.p. 35- 53, doi: 10.1016/j.riam.2013.09.017.
- [4] Candida Genoma Base, Gene ACE2. Consultado 18 de julio del 2016. Recuperado de: http://www.candidagenome.org/cgi-bin/locus.pl?dbid=CAL0000191878&seq_source=C.%20albicans%20SC5314%20Assembly%2022
- [5] MO BIO Laboratories, Inc. Ultra clean®, Gelspin®, DNA extraction kit. Consultado: 16 de julio de 2016. Recuperado de: <http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/12400.pdf>
- [6] Thermo Fisher Scientific. CloneJET PCR Cloning Kit. Consultado: 16 de julio de 2016. Recuperado de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231>
- [7] 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: 16 de julio de 2016. Recuperado de: www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/39_AISLAMIENTO_Y_PURIFICACION_DEL_DNA_DE_UN_PLASMIDO_RECOMBINANTE.pdf
- [8] EpicentreBio. MasterPure™ DNA purification kit. Consultado: 16 de julio de 2016. Recuperado de: [http://www.researchgate.net/publications.PublicPostFileLoader.html?id=54b6f279d039b1792c8b45ea&key=e52d9e76-cc5f-4022-904c1489e6f97e34](http://www.researchgate.net/publications/PublicPostFileLoader.html?id=54b6f279d039b1792c8b45ea&key=e52d9e76-cc5f-4022-904c1489e6f97e34).