

Glucanasas de la pared celular del hongo patógeno *Sporothrix schenckii*.

Cell Wall Glucanases of the Pathogenic Fungus *Sporothrix schenckii*.

Hernández Martínez, Lizbeth J.¹, Ramírez Olvera Alondra N.², Ortega Guzmán Dulce G.³, Virrueta Alatorre, Jaime M.⁴, Piñón Trujillo Abraham⁵, Ángeles Torres Katherine Y⁶, Razo Soria Tannia⁷, Niño-Vega Gustavo A.⁸

Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato^{1,2,3,4,5,6,7,8}
lj.hernandezmartinez@ugto.mx¹, an.ramirezolvera@ugto.mx², dg.ortegaguzman@ugto.mx³, jm.virruetaalatorre@ugto.mx⁴, a.pinontrujillo@ugto.mx⁵, ky.angelestorres@ugto.mx⁶, trazo16@ugto.mx⁷, gustavo.nino@ugto.mx⁸.

Resumen

La importancia de la pared celular para la supervivencia de la célula fúngica, así como el hecho de los componentes estructurales de la misma son requeridos para la integridad del hongo, pero no se encuentran presentes en el hospedero humano, hacen de sus mecanismos de síntesis el foco de estudios en busca de tratamientos antifúngicos más específicos y efectivos. La presente propuesta se enfoca en evaluar la expresión diferencial de cuatro genes de glucanasas de pared celular, producidas por *Sporothrix schenckii* en las fases de levadura y micelio.

Palabras clave: Pared Celular Fúngica, *Sporothrix schenckii*, beta-glucanasas de pared celular.

Introducción

En hongos patógenos de humanos, la pared celular es la primera interfase de contacto en la interacción hongo-hospedero, la cual puede definir a través de diferentes mecanismos si la micosis se desarrolla o no [1]. La importancia de la pared celular para la supervivencia de la célula fúngica, así como el hecho de que los componentes estructurales de la misma son requeridos para la integridad del hongo, pero no se encuentran presentes en el hospedero humano, hacen de sus mecanismos de síntesis el foco de estudios en busca de tratamientos antifúngicos más específicos y efectivos [1]. A diferencia de la estrategia clásica de enfocarse en las síntesis de componentes de la pared celular, la presente propuesta cambia de perspectiva enfocándose en las enzimas extracelulares envueltas en la remodelación de la pared celular fúngica, las cuales estarían mucho más accesibles para un futuro desarrollo de compuestos dirigidos a disminuir (o aumentar) la actividad de dichas enzimas y en consecuencia, producir cambios en la pared celular que podrían desenmascarar a los componentes inmunogénicos de la misma, permitiendo al sistema inmune del hospedero la eliminación del agente infeccioso [2]. Como organismo modelo para explorar esta estrategia se usará a *Sporothrix schenckii*, uno de los agentes conocidos de la esporotricosis, micosis subcutánea de humanos y otros mamíferos, para el que contamos con información de la composición y mecanismos de síntesis de su pared celular, así como con herramientas de manipulación genética ya probadas en el mismo [2,3,4]. Además, desde 2014 tenemos su genoma disponible [5]. Los mecanismos de remodelación de la pared celular a ser estudiados en esta propuesta se enfocarán en la β -glucana, componente estructural de la pared de *S. schenckii*, y como un primer acercamiento, se analizará la expresión de cinco genes posiblemente envueltos en su remodelación *in situ* (Crf1, Eng1, Eng2, Eng3 y EglC), de acuerdo con un análisis previo del proteoma de la pared celular de las células levaduriformes de *S. schenckii*.

Metodología y Resultados

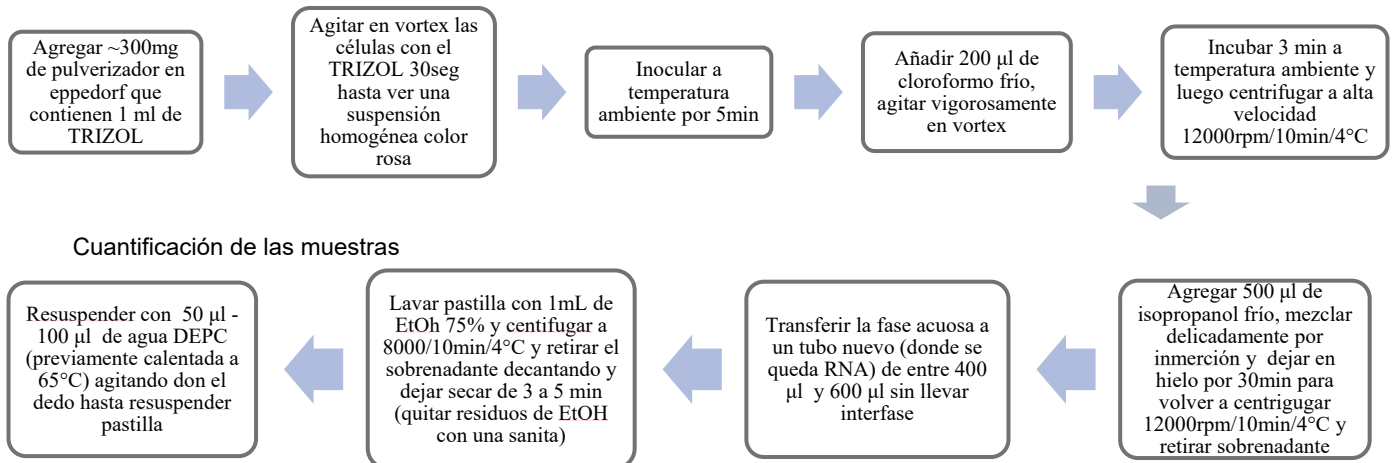
Extracción de ARN de ambas fases (levadura y micelio) y de la fase levaduriforme crecidas en YPD, para producción de DNAC y ensayos de RT-PCR.

Partiendo de micelio, las células se extraen por medio de vacío, gracias a un sistema matraz Kitasato, un embudo Buschner y papel para cromatografía, se coloca un poco de agua fría y poco a poco el inóculo y gracias al vacío se adhieren los micelios en el papel, después, se dan lavados con agua estéril y fría, los suficientes hasta que el agua comience a percibirse transparente. Posteriormente, el micelio se despega del papel y se coloca en un tubo Falcón, llevándolo a nitrógeno líquido, congelamiento súbito.

Partiendo de levaduras, estas se colocan en tubos de ultracentrifuga. Posteriormente las células se llevan a centrifugación a $5\ 000 \times g/4^{\circ}\text{C}/5\text{min}$, formándose una pastilla en fondo. La pastilla se lava y nuevamente se centrifuga, se lava hasta que el agua se vea más clara. La pastilla obtenida se lleva a nitrógeno líquido, congelamiento súbito.

Posteriormente congeladas las células, se maceran en un mortero, hasta obtener un polvo muy fino, evitando la descongelación agregando más nitrógeno líquido durante la maceración.

La extracción se realizó por el método de TRIZOL., de acuerdo con el siguiente esquema:

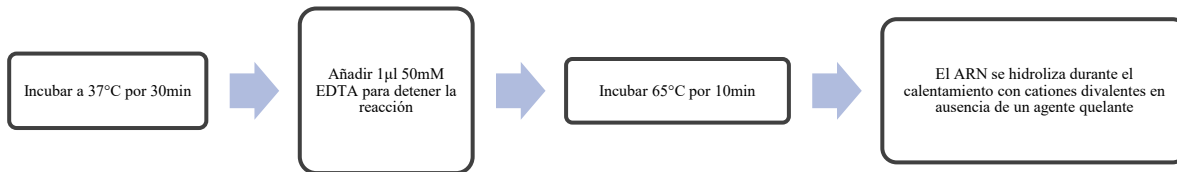


Se estimaron las concentraciones en el NanoDrop, para hacer una conversión de $\text{ng}/\mu\text{l}$, a $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la reacción, ya que por una reacción de $10\mu\text{l}$ total se agrega $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ARN. La cuantificación del RNA se hace para saber su concentración y que tan puras están las muestras para saber si son aptas o no para poder obtener cDNA. Pureza de RNA, $260/280$ (2.0-2.2) si el valor es inferior está contaminado con proteínas, $260/230$ (1.8-2.0) si el valor es inferior hay presencia de contaminantes que absorben a 230nm como son los fenoles y sales. Una vez obtenido el RNA, se procedió a la eliminación de ADN genómico contaminante (DNAg) usando DNAsa (Tabla 1)

Tabla 1. Reacción de DNAsa para limpieza del RNA

Para obtener $10\mu\text{l}$ de ARN limpio con DNAsa se tiene que hacer la siguiente reacción	
1 μg RNA	El volumen de RNA que se añade se determina dependiendo la concentración de la muestra y con la formula $C1V1=C2V2$ para obtener una concentración de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
Buffer DNAsa I 10X	1 μl
Enzima DNAsa I 1 μl	1 μl
H2O DEPC	Volumen requerido para $10 \mu\text{l}$ de volumen final

Siguiendo el siguiente procedimiento:



Una vez tratado con DNAsa, el ARN se corre en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE, para determinar la integridad de las muestras (Figura 1)

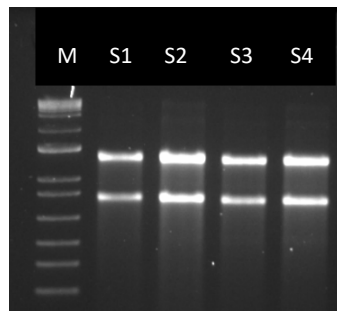


Figura 1. Muestras de ARN de la fase micelial de *S. schenckii* (S1 a S4) después del tratamiento con DNAsa. M, marcador de peso molecular. Corrida en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE.

Una vez determinada la integridad del RNA, se procedió a realizar una PCR control, con la finalidad de determinar si la limpieza del RNA había sido exitosa. Para ello, se realizaron reacciones de PCR simple, para las que no se esperaba amplificación de no haber DNAg contaminante. Las reacciones para cada muestra de RNA se realizaron de acuerdo con la Tabla 2:

Tabla 2. Reacción de PCR simple, para determinar la no contaminación de las muestras de RNA con DNAg

Para obtener 25µl en cada tubo de PCR, se tiene que hacer la siguiente reacción :	
10X Buffer Taq	2.5 µl
dNTPS(2mM)	2.5 µl
Fw primer [10mM]	2.5 µl
Rv primer [10mM]	2.5 µl
MgCl ₂ [25mM]	2 µl
RNA	1 µl
Taq Polimerasa	0.3 µl
H ₂ O DEPC	11.7 µl
Volumen final	25µl

Las reacciones de PCR control se realizaron bajo las condiciones presentadas en Figura 2

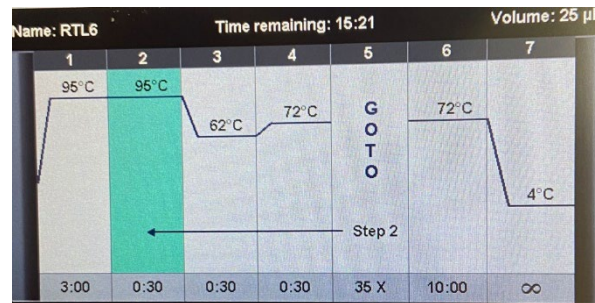
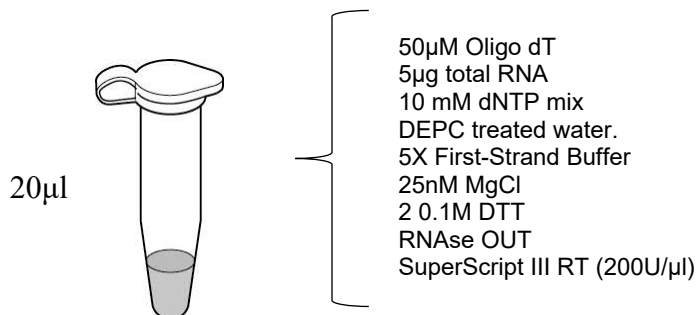


Figura 2. Condiciones de PCR simple, para determinar que las muestras de RNA se encuentran libres de DNAg.

Síntesis de cDNA (RT-PCR)

La síntesis de cDNA, se realizó a partir de RNA, utilizando la enzima Transcriptasa Inversa (SuperScript III), que puede llevar a cabo la síntesis de DNA complementario a partir de RNA. Para ello, se ensamblaron las reacciones en 20µl de volumen final, añadiendo los volúmenes de cada componente de la reacción de manera de no sobrepasar el volumen final (siguiendo las indicaciones del kit SuperScript III), y se realizaron reacciones de PCR de punto final, de acuerdo con el siguiente esquema, usando las mismas condiciones de amplificación mostradas en la Figura 2:



Para confirmar la amplificación de los productos del PCR de punto final, se corrió un gel de agarosa al 1.5% en TBE (Figura 3)

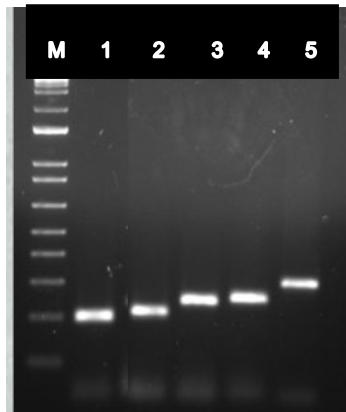


Figura 3. RTPCR punto final. Se muestra la expresión semicuantitativa de 5 genes 1. Crf1, 2. Eng1, 3. Eng2, 4. Eng3, 5. EglC, a partir de cDNA de micelio, los cuales codifican para β -glucanas. M, marcador de peso molecular.

Conclusiones y Perspectivas

Se realizó con éxito la evaluación de los 5 genes de interés Crf1, Eng1, Eng2, Eng3 y EglC que transcriben para β -glucanasas de pared celular de *S. schenckii* a partir de micelio y levadura. Dando que, ambas formas expresan los genes mencionados, se podría decir que, en su forma micelial los genes se expresan mayormente, pues las bandas en la RTPCR son más Intensas, lo que significa, que el número de copias de material genético, es mayor. Sin embargo, debido a problemas de funcionamiento del termociclador de Tiempo Real en el Departamento de Biología, no fue posible realizar las reacciones de Tiempo Real, por lo que, para cerciorar lo anterior es necesario realizar dicho análisis.

Referencias

1. Gow, N. A. R., Latge, J., and Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiol. Spectr.* 5, 1–25. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016
2. Villalobos-Duno HL, Barreto LA, Alvarez-Aular Á, Mora-Montes HM, Lozoya-Pérez NE, Franco B, Lopes-Bezerra LM and Niño-Vega GA (2021) Comparison of Cell Wall Polysaccharide Composition and Structure Between Strains of *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Front. Microbiol.* 12:726958. doi: 10.3389/fmicb.2021.726958
3. Clavijo-Giraldo, D. M., Martínez-Alvarez, J. A., Lopes-Bezerra, L. M., Ponce-Noyola, P., Franco, B., Almeida, R. S., et al. (2016). Analysis of *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. *J. Microbiol. Methods* 122, 73–77. doi: 10.1016/j.mimet.2016.01.014
4. Lozoya-Pérez, N. E., Clavijo-Giraldo, D. M., Martínez-Duncker, I., García-Carnero, L. C., López-Ramírez, L. A., Niño-Vega, G. A., et al. (2020). Influences of the culturing media in the virulence and cell wall of *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis*, and *Sporothrix globosa*. *J. Fungi* 6:323. doi: 10.3390/jof6040323

5. Teixeira, M.M.; de Almeida, L.G.; Kubitschek-Barreira, P.; Alves, F.L.; Kioshima, E.S.; Abadio, A.K.; Fernandes, L.; Derengowski, L.S.; Ferreira, K.S.; Souza, R.C.; et al. (2014) Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *BMC Genom.*, 15, 943.