Construcción de la mutante Msn4 de *Cándida glabrata*, un patógeno oportunista

Diana L. Vázquez-Durán[1], Guadalupe Gutiérrez-Escobedo[2], Alejandro De Las Peñas[3]
[1]diana.vazdur96@gmail.com
[2]maria.gutierrez@ipicyt.edu.m y [3]cano@ipicyt.edu.mx
[1]Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química - Centro Universitario;
Cerro de las Campanas s/n C.P. 76010, 76010 Santiago de Querétaro, Qro.
[2 y 3]Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C.- División de Biología Molecular;
Camino a la Presa de San José #2055, Lomas 4ta sección, 78216, San Luis Potosí, S.L.P.
México

Resumen

Cándida glabrata es un patógeno oportunista que ha desarrollado una alta resistencia al estrés oxidante, lo que dificulta su eliminación por el sistema inmunológico del huésped. Los genes que codifican enzimas que le confieren esta resistencia, están reguladas por factores de transcripción como Yap1 y Skn7. En *S. cerevisiae* los factores de transcripción Msn2 y Msn4 están relacionados con la respuesta a estrés general y tienen sus respectivos ortólogos en *C. glabrata*. Se construyó la mutante *msn4*Δ de *C. glabrata* mediante técnicas de biología molecular, como la transformación de *C. glabrata* con la construcción *msn4*Δ. La mutación se confirmó mediante PCR: se estableció la ausencia de *MSN4*, y la estructura correcta de los extremos 5´ y 3´.

Palabras clave: *Candida glabrata*, respuesta al estrés oxidante, Msn4, transformación por acetato de litio.

Abstract

Candida glabrata is an opportunistic pathogen that has developed high resistance to oxidative stress, making it difficult to extract it from the host's immune system. The genes that encode enzymes that confer this resistance are regulated by transcription factors such as Yap1 and Skn7. In S. cerevisiae the transcription factors Msn2 and Msn4 are related to the general stress response and have their corresponding orthologs in C. glabrata. The msn4Δ mutant of C. glabrata was constructed by molecular biology techniques, such as the transformation of C. glabrata with the msn4Δ construct. The mutation was confirmed by PCR: the absence of MSN4 was established, and the correct structure of the 5´ and 3´ ends.

Keywords*: Candida glabrata, oxidative stress response, Msn4, transformation by lithium acetat*

Artículo arbitrado

Recibido:	Aceptado:
08 de septiembre de 2019	25 de septiembre de 2019

I. Introducción

Cándida glabrata es un comensal en el tracto gastrointestinal y genitourinario humano que, en condiciones de inmunodepresión, puede causar infecciones masivas severas (Briones-Martin-Del-Campo et al., 2014; Cuellar-Cruz et al., 2008). *C. glabrata* se ha adaptado evolutivamente a las defensas inmunes del huésped, lo que le permite ser un patógeno exitoso (Brown, Haynes y Quinn, 2009; Kumar, Askari, Sahu y Kaur, 2019; Roetzer et al., 2011). Entre estas adaptaciones se incluyen la adherencia a células epiteliales de huésped (Cuellar-Cruz et al., 2008; Kumar et al., 2019; Zordan et al., 2013), resistencia a antifúngicos (Cuellar-Cruz et al., 2008; Gutierrez-Escobedo, Orta-Zavala, Castaño y De-Las-Peñas, 2013; Zordan et al., 2013), formación de biopelículas (Kumar, Askari et al. 2019) y una alta supervivencia al ataque de células fagocíticas (Briones-Martin-Del-Campo et al., 2014; Gutierrez-Escobedo et al., 2013).

Las células fagocíticas son la primera línea de defensa contra las infecciones fúngicas (Roetzer et al., 2011; Roetzer, et al., 2008); generan fagolisosomas donde predomina un ambiente hostil con especies reactivas de oxígeno (ERO): como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el superóxido (O_2^-), y el radical hidroxilo (OH) (Briones-Martin-Del-Campo et al., 2014; Brown et al., 2009). Debido a su inestabilidad, las ERO causan daños al ADN, proteínas y lípidos, lo que resulta en la destrucción de los patógenos fagocitados (Cuellar-Cruz et al., 2008; Gutiérrez-Escobedo, et al., 2013; Luna-Arvizu, 2017). Sin embargo, *C. glabrata* puede desintoxicar estos químicos mediante la síntesis de moléculas antioxidantes que ayudan a mantener el equilibrio redox (Briones-Martin-Del-Campo et al., 2014; Brown et al., 2009). Estas moléculas pueden ser enzimas (catalasas, superoxidodismutasas y peroxidasas) o moléculas no enzimáticas (glutatión y tiorredoxinas) (Briones-Martin-Del-Campo et al., 2014; Cuellar-Cruz et al., 2008, Gutierrez-Escobedo et al., 2013).

La respuesta al estrés oxidante (REO) en levaduras está regulada mediante diversos factores de transcripción (Cuellar-Cruz et al., 2008; Roetzer, et al., 2008). La REO en *S. cerevisiae* está en parte bajo el control de ScYap1, ScSkn7, ScMsn2 y ScMsn4 (Cuellar-Cruz et al., 2008). En *C. glabrata* se han demostrado que las funciones de los ortólogos CgYap1 y CgSkn7 están conservadas (Briones-Martin-Del-Campo et al., 2014; Cuellar-Cruz et al., 2008), mientras que el efecto de CgMsn2 y CgMsn4 se ha reportado como significativo en esta respuesta (Cuellar-Cruz et al., 2008; Luna-Arvizu, 2017; Roetzer, et al., 2008).

En *S. cerevisiae* Msn2 y Msn4 son factores transcripcionales con dominios de unión al DNA de dedos de Zinc C_2H_2 (Zf-C_2H_2) (Cuellar-Cruz et al., 2008), que reconocen la secuencia STRE y que están altamente conservados (ver Figura 1), por lo que su función podría estar también conservada en los ortólogos CgMsn2 y CgMsn4. En el caso de los ortólogos de Msn2, se ha encontrado que comparten varios blancos comunes (Cromack y Falkow, 1999; Roetzer, et al., 2008); sin embargo, se conoce menos sobre Msn4; por esa razón, es necesario estudiarlo. La mutante de *C. glabrata msn4*Δ se construyó con el objetivo de caracterizar la participación de Msn4 en la REO.

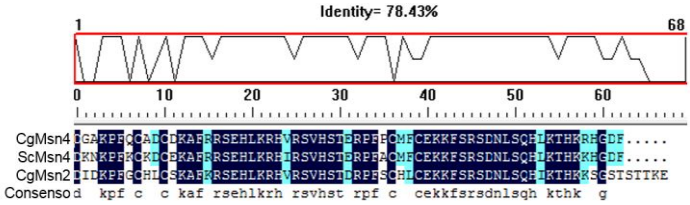


Figura 1. Alineación del dominio de dedo de zinc de las proteínas CgMsn4, ScMsn4 y CgMsn2. Se observa una alta conservación de secuencia, especialmente entre CgMsn4, ScMsn4. Al final se muestra la secuencia consenso. Fuente: elaboración propia.

II. Materiales y métodos

A. Obtención del DNA para la transformación

Los plásmidos pRD97 y pGH9 y se extrajeron mediante un sistema comercial estandarizado (Thermo Scientific GeneJET #K0502) a partir de las cepas de *E. coli* 1789 (pRD97, *msn4*Δ::*hph*, R. Domergue y B. Cormack) y 4274 (pGH9, P_{EPAI}::*FLPI*::*hph*, control de transformación, colección del laboratorio). Las cepas se inocularon en 3 mL de caldo LB adicionado con carbenicilina (100 µg/mL) y se incubaron durante toda la noche en

agitación a 30 °C. El plásmido pRD97 se digirió con la enzima de restricción *BcgI* (New England Biolabs ©). Las condiciones de la reacción fueron: 40 µl de pRD97, 6 µl de SAM (S-adenosil-metionina) al 1 % en etanol, 10 %, 6 µl de Buffer 3.1 en un volumen final de 60 µl. La reacción se incubó a 37 °C durante 1 h y se inactivó a 60 °C por 20 minutos.

B. Transformación de C. glabrata

La cepa parental de *C. glabrata* BG14 se inoculó en 5 mL de caldo YPD (1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % glucosa) y se incubó durante toda la noche en agitación a 30 °C. De este cultivo se tomaron 300 µl y se inocularon en 30 ml de YPD fresco. El inóculo se dejó en agitación a 30 °C hasta alcanzar una O.D. $_{600\ nm}$ de 0.7891. Las células se obtuvieron por centrifugación a 3500 rpm, se lavaron con agua mili-Q estéril y se concentraron en 300 µl de LiAc 100 mM. A 50 mL de las células se agregaron 240 µl de PEG 50 %, 36 µl de LiAc 1 M, 25 µl de ssDNA (DNA de cadena sencilla de esperma de salmón) y 50 µl de plásmido pRD97, pGH9 (control positivo) o 50 µl de Tris10 mM sin DNA (control negativo), según el caso. La mezcla se incubó en agitación a 30 °C durante 45 min. Después se adicionaron 43 µl de DMSO y se incubó a 42 °C durante 15 min. Las células se recuperaron por centrifugación, se resuspendieron en 600 µl de YPD y se incubaron en agitación durante 4 h a 30 °C. Posteriormente, las transformaciones se platearon en cajas de YPD adicionado con higromicina (500 µg/ml) usando 300, 200 y 100 µl para la transformación con pRD97, 300 µl para pGH9 y 300 µl para la transformación sin DNA. Las cajas se dejaron incubando por 48 h a 30 °C. Finalmente, se seleccionaron 24 colonias de las que se realizaron dos purificaciones consecutivas por estría en cajas de YPD adicionado con higromicina (500 µg/ml) e incubadas durante 48 h a 30 °C.

C. Extracción de DNA genómico

Las colonias purificadas se inocularon en 3 mL de YPD y se incubaron durante toda la noche con agitación a 30 °C. Las células se colectaron por centrifugación a 15,000 rpm por 1 min y se resuspendieron en 500 µl de Buffer A (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, tritón 1 %, SDS 1 %). Se agregaron 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se incubó a 42 °C por 15 min. Se colocó en el FastPrep-24™ (MP Biomedicals™) por 1 s a 6 m/s. Se centrifugó a 15,000 rpm por 1 min, se recuperó la fase acusa y se agregaron 15 µl de NaCl 5 M y 1 mL de etanol 100 %. Se mezcló y centrifugó a 15,000 rpm por 1 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet se lavó con 1 mL de etanol 70 % y se secó. El DNA se resuspendió en 250 µl de Tris 10 mM con RNase Cocktail™ (InvitrogenTM) y se incubó por 2 h a 37 °C.

D. Identificación de colonias msn4Δ

La identificación de colonias con la mutación *msn4*Δ se realizó mediante PCR por ausencia, PCR de los extremos 5´y 3´y PCR *across*. Los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 1. A partir de las colonias identificadas como *msn4*Δ se realizó un pasto y se guardó en glicerol 15 %.

Oligonu-cleótido	Secuencia	Descripción
15	CGATAAGAGGCCACGTGC TTTATG	P_{PGK1}Rv-out
16	AGAAATACGCACGAACACG ATATAGAGG	3ÚTRHIS3Fw-out
417	GCGGGTACCTTACAGCAG TTAATGATTGGG	*MSN4*, 3'UTR
418	GGCAGCAGAAGAGTCAG	*MSN4*, interno
419	GCGGGATCCTAAAGTCTCC GTGTCTTTTATGTG	*MSN4*, interno
1218	CTGTGTATTGTGTGCAGGG	*MSN4*, 5'UTR

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en el presente trabajo. Fuente: elaboración propia.

III. Resultados y discusión

El plásmido pRD97 se digirió para obtener un fragmento de 3146 pares de bases (ver Figura 2), que contiene la secuencia que codifica el gen *hph* con los extremos 5´y 3´ homólogos a *MSN4*, ya que se busca la inserción del fragmento por recombinación homóloga en el sitio del gen *MSN4* (ver Figura 3). El plásmido pRD97 tiene otro sitio de restricción para *BcgI*, por lo que se muestran bandas adicionales en el gel de 2.4 Kb y 1.6 Kb.

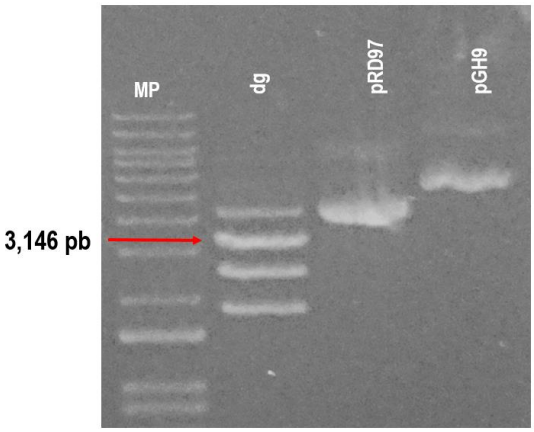


Figura 2. Digestión del plásmido pRD97. MP: marcador de peso molecular, dg: digestión del plásmido pRD97, pRD97: plásmido pRD97 sin digerir, pGH9 plásmido pGH9. Se indica el fragmento de interés para la transformación. Fuente: elaboración propia.

El crecimiento de colonias definidas de las células transformadas con pGH9 (datos no mostrados) evidencia la efectividad del método de transformación. Respecto a las transformantes con el plásmido pRD97, se observó un crecimiento homogéneo en las cajas con 300 y 200 µL y colonias aisladas en la caja con 100 µL (datos no mostrados), por lo que el resto de las pruebas se realizaron considerando únicamente la caja con 100 µL.

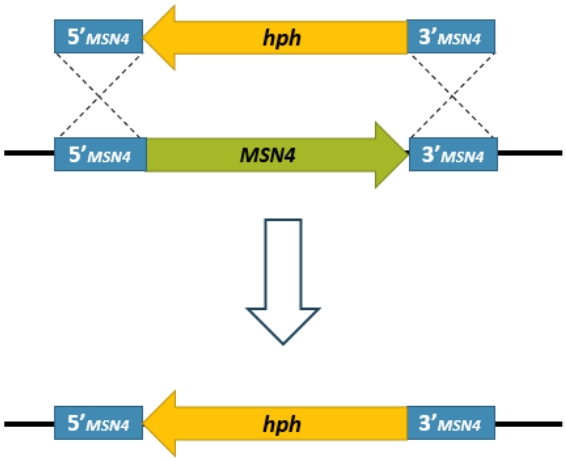


Figura 3. Transformación de *C. glabrata* BG14. La inserción del fragmento de interés se hará por doble recombinación homóloga en el sitio del gen *MSN4*, la sustitución conferirá resistencia a higromicina. Fuente: elaboración propia.

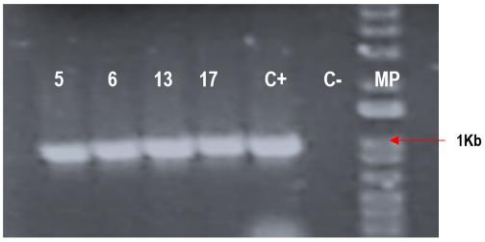
A. PCR por ausencia

Para el diagnóstico por ausencia se usaron los oligonucleótidos #418 y #419, los cuales son complementarios a secuencias dentro del gen *MSN4*, por lo que de llevarse a cabo la recombinación homóloga no se observaría amplificación. El par de oligonucleótidos empleados dan un producto de PCR de 987 pb. Del total de las colonias analizadas, sólo se detectaron cuatro candidatas, que corresponden con los números 5, 6, 13 y 17. Como control positivo, se empleó la cepa BG14 de *C. glabrata*.

Figura. 4. Las colonias 5, 6, 13 y 17 carecen del gen *MSN4*. Los oligonucleótidos #418 y #419 un fragmento en aproximadamente 987 pb. Se busca la ausencia de amplificación. MP: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C- control negativo, números 1 a 21 colonias evaluadas. Fuente: elaboración propia.

B. PCR de los extremos 5´y 3´

De las colonias candidatas 5, 6, 13 y 17 se llevó a cabo el diagnóstico de los extremos 5´y 3´. Se emplearon oligonucleótidos complementarios al genoma de *C. glabrata* y al gen *hph*. Para el extremo 5´, se emplearon los oligonucleótidos #1218 y #16, que amplifican un fragmento de 1 kb. Para el extremo 3´se emplearon los oligonucleótidos #15 y #417, que amplifican para un fragmento de 1 kb. Sólo las colonias 13 y 17 (Figura 5 a y b) tienen un fragmento amplificado con los tamaños deseados.



a)

b)

Figura 5. Las colonias 13 y 17 muestran recombinación en los extremos 5' y 3' del gen *MSN4*. a) PCR del extremo 5´, todas las colonias amplificaron un producto de 1Kb b) PCR del extremo 3´, sólo las colonias 13 y 17 amplificaron un fragmento de 1 Kb. MP: marcador de peso, C+: control positivo, C- control negativo, números: colonias evaluadas. Fuente: elaboración propia.

C. PCR across

Para este análisis se emplearon los oligonucleótidos #1218 y #417, con un producto de 3.8 Kb (ver Figura 6). La cepa BG14 de *C. glabrata* se empleó como control negativo de recombinación, de la cual se espera un fragmento de 3.4 Kb. Como control positivo se empleó la cepa *msn2Δ msn4Δ* de *C. glabrata*. Las cepas 13 y 17 fueron positivas.

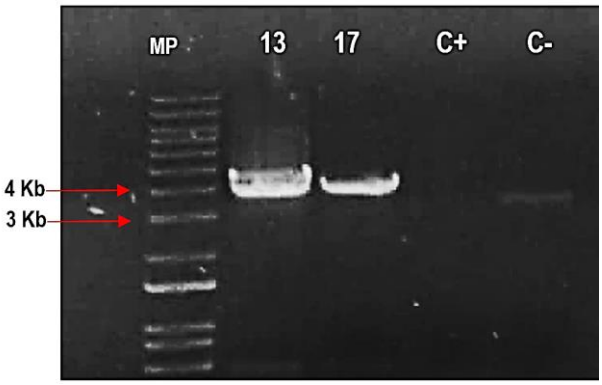


Fig. 6. Las colonias 13 y 17 son positivas a la recombinación en el sitio del gen *MSN4*. Se muestran los fragmentos amplificados de 3.8 Kb. MP, marcador de peso molecular. C+: control positivo *C. glabrata msn2Δ msn4Δ*, C- control negativo de recombinación *C. glabrata* BG14. Fuente: elaboración propia.

IV. Conclusiones

C. glabrata tiene diversos factores de virulencia cuyos mecanismos de acción representan importantes áreas de estudio para desarrollar estrategias en el tratamiento de las infecciones que genera. Durante la obtención de la mutante *msn4*Δ fue evidente la importancia de la preparación reciente de las soluciones de transformación, ya que el protocolo debió realizarse varias veces. Posiblemente las colonias 5 y 6 resultaron negativas porque la secuencia de DNA insertada sufrió algún tipo de daño (corte) en su trayecto al interior de la célula, o bien, pudo tratarse de una inserción en tándem. El control positivo en la PCR *across* posiblemente no amplificó por un exceso de DNA en la misma. Con la mutante obtenida se podrán llevar a cabo algunas pruebas para determinar el efecto que Msn4 tiene sobre la respuesta al estrés oxidante en *C. glabrata*.

V. Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro, al comité organizador del 21° Verano de la Ciencia, al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica y, especialmente, al Dr. Alejandro De Las Peñas Nava y a todo su equipo de trabajo, por toda la ayuda, en tantos sentidos.

VI. Referencias

Briones-Martin-Del-Campo, M., Orta-Zavalza, E., Juarez-Cepeda, J., Gutierrez-Escobedo, G., Cañas-Villamar, I., Castaño, I., & De Las Peñas, A. (2014). The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen Candida glabrata. *Revista Iberoamericana de Micologia, 31*(1), pp. 67–71. Doi: https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.012

Brown, A. J., Haynes, K., & Quinn, J. (2009). Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology, 12*(4), pp.384–391. Doi: https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.06.007

Cormack, B. P., & Falkow, S. (1999). Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen Candida glabrata. *Genetics, 151*(3), pp. 979–987.

Cuéllar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Cañas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castaño, I., & De Las Peñas, A. (2008). High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen Candida glabrata is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryotic Cell, 7(*5), pp. 814–825. Doi: https://doi.org/10.1128/EC.00011-08

Gutiérrez-Escobedo, G., Orta-Zavalza, E., Castaño, I., & De Las Peñas, A. (2013). Role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen Candida glabrata. *Current Genetics, 59*(3), 91–106. Doi: https://doi.org/10.1007/s00294-013-0390-1

Kumar, K., Askari, F., Sahu, M., & Kaur, R. (2019). Candida glabrata: A Lot More Than Meets the Eye. *Microorganisms, 7*(2), 39. Doi: https://doi.org/10.3390/microorganisms7020039

Luna-Arvizu, G. G. (2017). *La respuesta al estrés oxidante de Candida glabrata a través de la regulación génica de CTA1* (Tesis de pregrado). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., San Luis Potosí, S.L.P, 2017.

Roetzer, A., Gregori, C., Jennings, A. M., Quintin, J., Ferrandon, D., Butler, G., … Schüller, C. (2008). Candida glabrata environmental stress response involves Saccharomyces cerevisiae Msn2/4 orthologous transcription factors. *Molecular Microbiology, 69(*3), pp. 603–620. Doi: https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06301.x

Roetzer, A., Klopf, E., Gratz, N., Marcet-Houben, M., Hiller, E., Rupp, S., … Schüller, C. (2011). Regulation of Candida glabrata oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS Letters, 585*(2), pp. 319–327. Doi: https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.006

Zordan, R. E., Ren, Y., Pan, S. J., Rotondo, G., Iluore, A. D. L. P., & Cormack, B. P. (2013). Expression plasmids for use in Candida glabrata. G3: *Genes, Genomes, Genetics, 3*(9), pp: 1675–1686. Doi: https://doi.org/10.1534/g3.113.006908