



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

GRADO EN BIOLOGÍA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA
RECOMBINANTE KRE9 DEL HONGO
PATÓGENO *Candida albicans* CON
ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA Y
PROTUMORAL**

Leire de Campos Mata

Julio 2013



eman ta zabal zazu

Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Índice

Resumen/Abstract	1
1. Introducción	2
2. Objetivos	4
3. Materiales y métodos	5
3.1. Mantenimiento de <i>C. albicans</i>	5
3.2. Extracción de DNA de <i>C. albicans</i>	5
3.3. Medida de la concentración de DNA	5
3.4. Diseño de cebadores para posterior PCR	6
3.5. Obtención del inserto de DNA mediante PCR	6
3.6. Clonación de DNA de <i>C. albicans</i> en un vector plasmídico	8
3.7. Digestión con endonucleasas de restricción para clonación	10
3.8. Ligación	11
3.9. Transformación de células competentes	11
3.10. Selección de clones recombinantes	11
3.11. Extracción y purificación de DNA plasmídico	12
3.12. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes	12
3.13. Expresión de la proteína Kre9	12
3.14. Extracción y purificación de proteínas recombinantes	13
3.15. Detección de la proteína recombinante Kre9 mediante Western Blotting	14
3.16. Eliminación de endotoxinas	15
3.17. Cuantificación de proteínas	15
3.18. Cuantificación de endotoxinas	16
4. Resultados	17
4.1. Obtención del inserto de DNA mediante PCR	17
4.2. Clonación de DNA de <i>C. albicans</i>	17
4.3. Expresión de la proteína recombinante Kre9	18
4.4. Cuantificación de proteínas y endotoxinas	19
5. Discusión	22
6. Bibliografía	25

Resumen

Candida albicans es un hongo dimórfico capaz de desencadenar una respuesta proinflamatoria mediada por citocinas que incrementa la adhesión de células tumorales al endotelio hepático, favoreciendo así el proceso de metástasis. La proteína Kre9 de *C. albicans* está relacionada con la citocina IL-1 β , la cual participa en la cascada proinflamatoria. Para estudiar el efecto de la proteína Kre9 en la actividad prometastática de *C. albicans*, esta se clonó en *Escherichia coli* mediante el vector comercial pETBlue-2; seguidamente se expresó y purificó mediante cromatografía. Los resultados indican que el procedimiento se llevó a cabo correctamente ya que se identificó la presencia de la proteína mediante SDS-PAGE y Western Blot. Por último, se retiraron las endotoxinas de la muestra mediante tratamiento con agarosa-polimixina y se determinó la concentración final de proteína y endotoxinas.

Abstract

Candida albicans is a dimorphic fungus which is able to trigger a cytokine-mediated pro-inflammatory response that increases tumor cell adhesion to hepatic endothelium, favoring metastasis. *C. albicans* Kre9 protein is related to cytokine IL-1 β , which participates in the pro-inflammatory cascade. In order to study the effect of Kre9 protein in the prometastatic activity of *C. albicans*, this protein was cloned in *Escherichia coli* using pETBlue-2 commercial vector; afterwards it was expressed and purified through chromatography. The results indicate that the procedure was accomplished efficiently because the protein was identified through SDS-PAGE and Western Blot. Finally, endotoxins were removed from the sample by treatment with agarose-polymyxin and protein and endotoxins concentrations were determined.

1. Introducción

Candida albicans es un hongo dimórfico asociado a animales de sangre caliente como un comensal habitualmente inocuo que se encuentra en la cavidad oral y tracto respiratorio de individuos sanos, y menos frecuentemente en el tracto vaginal de mujeres sanas. Al tratarse de un microorganismo oportunista, en ocasiones es capaz de manifestarse como patógeno en individuos con el sistema inmunitario debilitado. Estas infecciones son conocidas como candidiasis o candidosis, y tienen una mortalidad estimada del 30 al 40% (Edmond *et al.*, 1999). En estos últimos años las infecciones causadas por especies del género *Candida* son cada vez más frecuentes en pacientes con cáncer (Anttila, 1994), ya que su frecuencia en hospitales se ha visto incrementada por la utilización de catéteres, quimioterapia, y otros tratamientos inmunosupresores que favorecen la infección. En algunos de estos casos, *C. albicans* es capaz de diseminarse hematógicamente y puede causar serios problemas de salud al propagarse por múltiples órganos.

En esta situación, el hígado y el bazo tienen un papel importante en la eliminación de *C. albicans* y sus antígenos de la sangre. A su llegada a los órganos por vía hematógena, se adhiere primero a la línea de células endoteliales de la red vascular. Después, los microorganismos adheridos penetran a través de la barrera endotelial y se induce un mecanismo proinflamatorio en el que intervienen citocinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-1 β e IL-18 (Orozco *et al.*, 2000; Filler *et al.*, 1996). La producción de estas citocinas por las células del huésped juega un papel crítico en la activación de las células del sistema inmunitario y en la eliminación final del organismo.

Sin embargo, la activación de las células endoteliales hepáticas puede contribuir también a la adhesión y metástasis del melanoma B16 (MB16) mediante un mecanismo proinflamatorio mediado por citocinas como IL-1 β e IL-18 que incrementa la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 donde se termina uniendo el melanoma. Según esto, una inflamación originada en respuesta a la unión de *Candida* a los receptores endoteliales no solo tendría la función de atraer células del sistema inmunitario a la zona infectada para eliminar el invasor sino que, en pacientes con cáncer, inmunosuprimidos a causa de un tratamiento quimioterapéutico, podría incrementar indirectamente el riesgo de adhesión de células tumorales a esa misma zona, pudiendo suponer el inicio de una metástasis hepática.

Varios estudios han demostrado la importancia de las manoproteínas en la adhesión de las levaduras a las células epiteliales y endoteliales (Orozco *et al.*, 2000) del hospedador en los estadios preliminares necesarios para la colonización comensal o parásita, y en la activación de la cascada proinflamatoria de las células endoteliales. Además, algunos constituyentes de la pared celular de *C. albicans* como el glucano, la quitina, y especialmente el manano y las manoproteínas, son capaces de modular la respuesta inmune del hospedador (Ashman & Papadimitiou, 1995).

De hecho, nuestro grupo de investigación ha identificado las manoproteínas de *C. albicans* como el principal componente estimulador de la respuesta endotelial mediada por citocinas que induce un aumento de la adhesión tumoral (Ramirez-Garcia *et al.* 2011), y ha relacionado el receptor de manosa con el proceso pro-metastático inducido por *C. albicans* (Ramirez-Garcia *et al.* 2013). En estos estudios se obtuvieron, mediante técnicas proteómicas, fracciones manoproteicas de distinto peso molecular y punto isoeléctrico para comprobar cuales de ellas inducían un mayor aumento de la síntesis de citocinas y de la adhesión tumoral al endotelio hepático. Además, en la fracción que mayor efecto proadhesivo demostró, la comprendida entre un peso molecular de 45 y 66 kDa, se identificaron mediante espectrometría de masas 14 proteínas de *C. albicans* (Ramirez-Garcia *et al.* 2011), alguna de las cuales podría estar relacionada con el efecto prometastático de este hongo.

Además de las 14 proteínas citadas, la Kre9 ha sido identificada dentro de los rangos de peso molecular y punto isoeléctrico de la fracción gracias a su detección mediante Western Blot utilizando un anticuerpo anti-IL-1 β que bloquea su unión al receptor. La IL-1 β es una citocina que juega un papel crucial en la respuesta proinflamatoria del endotelio hepático ante moléculas microbianas tales como el lipopolisacárido o el manano (Asumendi *et al.*, 1996). Por tanto, la proteína Kre9 podría estar relacionada con la activación del receptor de la IL-1 β , mimetizando la acción de la citocina, y desencadenando la cascada proinflamatoria que favorece la adhesión de células tumorales sin necesidad de intermediarios. Es por esto que la proteína Kre9 resulta de gran interés para su estudio individualizado.

Por todo esto, en pacientes con cáncer, la activación de las células endoteliales mediante *C. albicans* o sus manoproteínas puede ser un factor de riesgo para desarrollar metástasis en el hígado. Entender el mecanismo mediante el cual este hongo favorece la

adhesión de células tumorales puede contribuir a identificar un tratamiento adecuado o profilaxis.

2. Objetivos

Hoy en día, la candidiasis continúa siendo un problema clínico importante, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Uno de los factores de inmunosupresión son las terapias con productos químicos o quimioterapias llevadas a cabo para el tratamiento de los enfermos con cáncer. A pesar de los avances en oncología, estos tratamientos tan agresivos siguen siendo los más utilizados para el tratamiento de esta enfermedad y como consecuencia de la inmunosupresión que generan, los microorganismos como *C. albicans* pueden suponer un grave problema para el paciente.

Partiendo de resultados previos obtenidos por nuestro grupo en los que se relacionan las infecciones hematógenas causadas por *C. albicans* con el aumento de metástasis hepáticas, el objetivo de este trabajo consistió en la clonación de la proteína recombinante Kre9, a partir de unas manoproteínas previamente aisladas y caracterizadas en *C. albicans* con actividad en el sistema inmunitario, para validar su efecto en la adhesión tumoral y su relación con la respuesta inmune.

Estos resultados abren la puerta al estudio individualizado del efecto de cada una de estas proteínas, y por tanto a la identificación de las principales moléculas efectoras de la respuesta protumoral de *C. albicans*. Además, la fabricación de anticuerpos monoclonales frente a las moléculas identificadas como efectoras podría utilizarse para mejorar la terapia anti-tumoral, y quizá también la antifúngica.

3. Materiales y métodos

3.1. Mantenimiento de *C. albicans*

Para la realización de este trabajo se empleó la cepa *C. albicans* UPV1413 (CECT13063) perteneciente a la colección de cultivos de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) que fue aislada de un paciente con candidiasis sistémica.

Las cepas fueron mantenidas a 4°C en tubos inclinados de medio Agar Glucosa Sabouraud (SDA) después de una incubación previa de 24 h a 24°C. Se realizaron resiembras mensuales en el mismo medio de mantenimiento.

3.2. Extracción de DNA de *C. albicans*

Las levaduras se cultivaron en 20 ml de caldo Sabouraud durante 24 h. Se recogieron las células obtenidas mediante centrifugación y se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Posteriormente, las levaduras ser resuspendieron en 400 µl de tampón Tris 10 mM pH 8 y se llevó la suspensión de células a un tubo de microcentrifuga con aproximadamente 0,3 g de bolas de vidrio estériles (0,5 mm de diámetro). Se agitaron vigorosamente los tubos durante aproximadamente 1 min en un vortex. Se incubó la mezcla 10 min en agua hirviendo y se centrifugó 1 min a 2500 g. El sobrenadante fue recogido y su concentración de DNA fue medida.

3.3. Medida de la concentración de DNA

Para cuantificar la concentración y establecer el grado de pureza de la muestra de DNA extraída de *C. albicans* se realizó una medida de la absorbancia a 260/280 en el NanoPhotometer (Implen, München, Germany).

3.4. Diseño de cebadores para posterior PCR

La PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa requiere de una pequeña secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la secuencia que se quiere amplificar que sirve como punto de partida para la replicación del ADN por la polimerasa. A este pequeño fragmento se le conoce como cebador o primer.

Para diseñar los cebadores necesarios para la amplificación del gen de la proteína Kre9 mediante PCR fue necesario primero buscar la secuencia de dicho gen en las bases de datos proporcionadas por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (Figura 1). Para generar los cebadores adecuados ha de tenerse en cuenta la región codificante (CDS) completa. Los cebadores se escogieron manualmente teniendo en cuenta las siguientes condiciones: longitud de 17-28 pb, contenido en GC de 40-60% y T^a de anillamiento (T_m) de 55-75°C (ambos cebadores deben tener T_m similares). Una vez hecho esto, se introdujo la secuencia del gen de interés y los primers escogidos en formato Fasta en el programa Primer3 para validarlos. Durante el diseño de los cebadores, se introdujeron en la secuencia dianas específicas para los enzimas de restricción y se añadieron algunas bases más en el extremo para facilitar la labor de los enzimas. Los cebadores utilizados aparecen reflejados en la Tabla 1.

3.5. Obtención del inserto de DNA mediante PCR

La secuencia clonada fue un producto de PCR obtenido a partir de la amplificación de la secuencia codificante del gen de la proteína Kre9. Las mezclas de reacción aparecen descritas en la Tabla 2 y el programa utilizado en la Tabla 3. La PCR GoTaq Master Mix (Promega Biotech Ibérica, Alcobendas, Madrid) es una solución lista para usar que contiene Taq DNA polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$ y tampones de reacción en su concentración óptima para una amplificación eficiente del DNA.

TATTTGCTTTAAAGATATCGGATACTTTTTTTTCCTTTTGAGTTTTGTTTTGTT
 TTGTTTTATTTAGATTAGTTTCTATTTTTTAATTAATATTCTACATTTCGTTATTG
 ACGACTACAACATATCAACGACCTAGCACATCCACCCACCAAGATAACACA
 ACTACAATCTATCAGACACATCTAGCAAAATGAGACAATTTCAAATCATAT
TAATTTCCCTTGTTGTTTCCATAATAAGATGTGTTGTTGCAGATGTTGACATCA
CATCACCAAAGAGTGGAGAACTTTTTCTGGTAGTTCTGGATCAGCAAGTATC
AAGATTACCTGGGATGATTCAGACGATTGAGACTCACCGAAATCTTTGGATAA
TGCCAAAGGGTACACAATTTCTTTATGTACTGGACCTACTTCAGATGGGGATA
TCCAGTGTGGATCCATTAGTCAAGAACGAAGCTATTTGAGGTAATCTAAA
ACAGTTCCATTGCCAGAACTCAGTACCTAATGGTTATTACTATTTCCAAATT
TACGTTACTTTCACTAATGGAGGTACCACTATTATTATTACCACGTTTCAA
TTGACTGGTATGTCTGGTCCAAGTCCACTTTAGATGTCACCGAAACAGGATC
AGTGCCAGCGGATCAAGCTTCAGGATTTGATACTGCAACTACTGCTGACTCCA
AATCTTTCACAGTTCCATATACCCTACAAACAGGGAAGACTAGATACGCACCA
ATGCAAATGCAACCAGGTACCAAAGTGACTGCTACAACCTGGAGTATGAAGTT
CCCAACTAGTGCTGTTACTTACTACTCAACAAAGGCTGGCACACCAAATGTGG
CCTCTACTATTACCCAGGTTGGAGTTATACTGCTGAATCTGCCGTTAACTAT
GCTAGTGTGCGCCATATCCAACATACTGGTATCCTGCCAGTGAACGAGTGAG
TAAGGCTACAATTAGTGCTGCTACAAAGAGAAGAAGATGGTTGGATTGAAT
GAGGGAAACGGTGCTTATAACTTAGATAAATGCTAACATTGGATTTTCATTTTT
CATTTTTTTTTTGGTTTAGTTTGGTTATTAGCTTGTTCAATAACATACAG
 ATCCAAGCTCAGCTCAAGACACAAGCAAAAAGAC

Figura 1. Secuencia del gen Kre 9 de *C. albicans* (negrita cursiva) y de las secuencias utilizadas como cebadores (subrayado)

Tabla 1. Cebadores utilizados para la producción de la proteína recombinante Kre9

KRE9	
Forward	5'-aaccggaattcgetatcagacacatctagcaaa-3'
Reverse	5'-tcctctctgcagatccaaccatcttcttc-3'

Para la visualización de las secuencias amplificadas se realizó una electroforesis en gel de agarosa en concentración de 1,5% a 100 V durante aproximadamente 45 min en una cámara de electroforesis Wide Mini-Sub CII GT (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El gel de agarosa se tiñó con GelRed (Biotium, Hayward, USA) y se visualizó mediante un transiluminador UV U:GENIUS (Syngene, Cambridge, United Kingdom). Cuando fue necesario, el DNA se recuperó desde el gel utilizando para ello el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Iberia, Madrid, España) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante.

Tabla 2. Mezcla de reacción utilizada para la amplificación mediante PCR del gen de *C. albicans* que codifica para la proteína Kre9

KRE9	
Master Mix	25 μ l
Cebador F	5 μ l
Cebador R	5 μ l
H₂O	5 μ l
DNA (611 ng/μl)	10 μ l

Tabla 3. Protocolo utilizado para la amplificación mediante PCR del gen de *C. albicans* que codifica para la proteína Kre9

KRE9		
T^a (°C)	T (min)	Ciclos
95	2:00	1
95	0:30	30
48	1:00	
72	2:00	
75	5:00	1

3.6. Clonación de DNA de *C. albicans* en un vector plasmídico

El vector utilizado en los experimentos de clonación y expresión de la proteína recombinante Kre9 fue el vector comercial pET-Blue (Novagen) (Figura 2). Entre las particularidades interesantes que presenta este vector se encuentra la presencia de una secuencia que codifica en el extremo amino terminal para una cola HSV que permite la inmunodetección de la proteína recombinante, siempre y cuando el inserto se haya clonado en la pauta de lectura correcta. Asimismo, este vector presenta una secuencia

que codifica para una cola de 6 histidinas, lo que permite la purificación por columna de afinidad de la proteína recombinante. Además este vector tiene la característica de que su zona de clonaje múltiple, donde cortan los enzimas de restricción una única vez en todo el plásmido y a donde se une el inserto, se sitúa dentro del gen que codifica el péptido lacZ- α . El gen lacZ- α , en presencia de su gen complementario que se encuentra en el genoma principal de la célula hospedadora, produce β -galactosidasa. Este compuesto, cuando hay X-gal en el medio, se rompe en dos moléculas, una de las cuales es de color azul. Cuando el inserto no se introduce en el plásmido, las colonias crecidas en placas con IPTG y X-gal son de color azul. En cambio, cuando el inserto se introduce dentro del plásmido en la zona de clonaje múltiple, el péptido lacZ- α queda interrumpido de tal manera que las colonias resultantes son de color blanco.

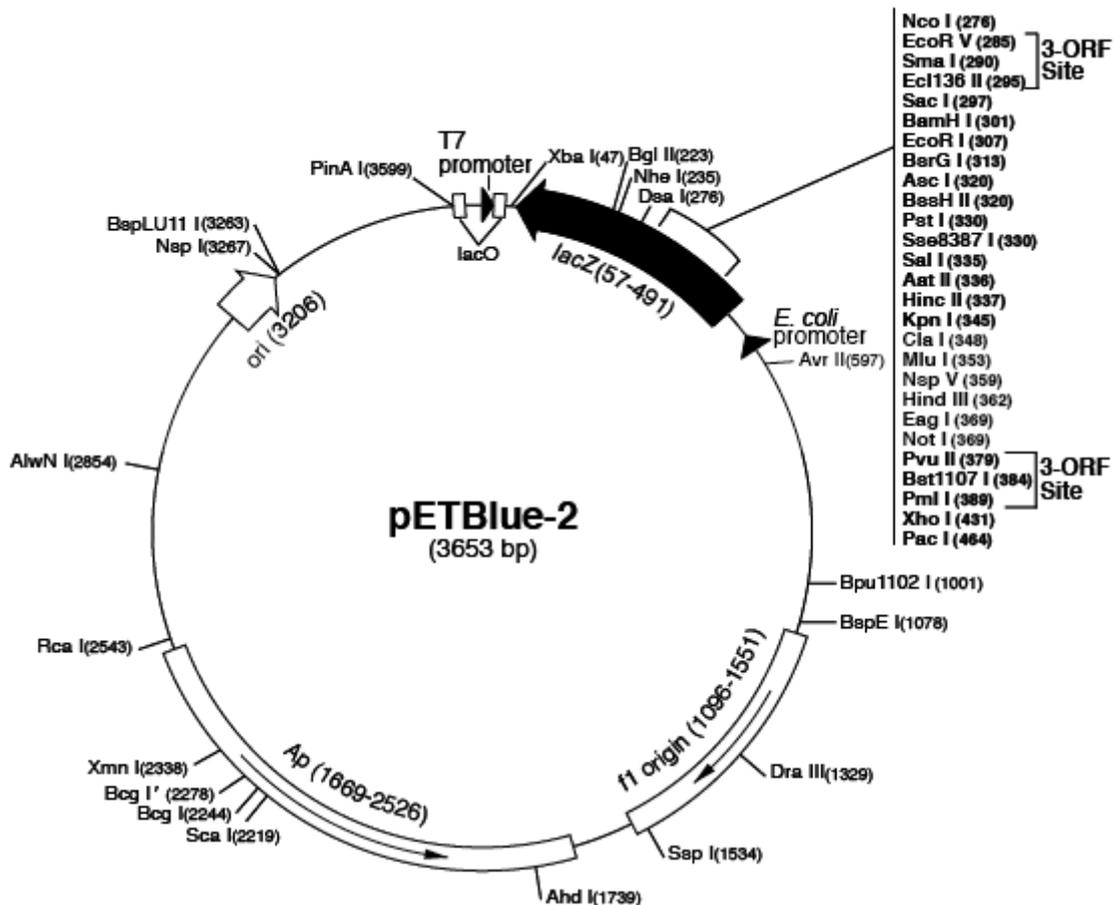


Figura 2. Mapa del vector comercial pETBlue-2

3.7. Digestión con endonucleasas de restricción para clonación

Tanto el vector pETBlue-2 como el amplicón fueron digeridos mediante las endonucleasas de restricción EcoRI y PstI. Cortar con dos enzimas de restricción es beneficioso para el proceso de clonación ya que evita que en el paso de ligación el vector y/o el amplicón se recircularicen. De esta manera, se favorece que la ligación ocurra entre plásmido y amplicón.

Las condiciones para el uso de los enzimas de restricción fueron las especificadas por la casa comercial suministradora (Takara, Seta, Otsu, Shiga, Japan). Se mezclaron en un microtubo de 500 µl las concentraciones indicadas en las tablas que se presentan a continuación.

Tabla 4. Mezcla de reacción para el corte del plásmido comercial pETBlue con los enzimas de restricción

KRE9	
H₂O	10 µl
Tampón H (10X)	2 µl
EcoRI	1 µl (15 u)
Pst I	1 µl (15 u)
Plásmido	6 µl (150 ng)

Tabla 5. Mezcla de reacción para el corte del gen Kre9 amplificado mediante PCR con los enzimas de restricción

KRE9	
Inserto	40 µl (600 ng)
Tampón H (10X)	5 µl
EcoRI	2,5 µl (15 u)
PstI	2,5 µl (15 u)

La incubación se llevó a cabo a 37 °C durante 1 h.

3.8. Ligación

Una vez purificado el DNA obtenido de la digestión con enzimas de restricción, se llevó a cabo la reacción de ligación de dichos fragmentos mediante el enzima T4-DNA ligasa siguiendo las proporciones recomendadas por la casa comercial. En los experimentos de ligación, la proporción molar vector:inserto utilizada fue de 1:3. La reacción de ligación se llevó a cabo a 16 °C durante aproximadamente 18 h.

3.9. Transformación de células competentes

Para los experimentos de transformación se utilizaron las células competentes Novablu Singles (Novagen, Darmstadt, Germany), que aseguran una elevada eficiencia de transformación y un elevado número de copias de plásmido. Los viales de células competentes mantenidos a -80°C se descongelaron manteniéndolos en hielo durante aproximadamente 5 min, tras los cuales se añadieron 10 ng de mezcla de ligación. Se incubaron los tubos durante 5 min más en hielo, y a continuación se sometió a las células a un choque térmico de 1 min a 42°C y se incubaron en hielo 5 min más. Seguidamente se sembraron en placas de agar Luria Bertani (LB) suplementadas con tetraciclina 12.5 µg/ml, carbenicilina 50 µg/ml, 40 µl de X-Gal y 40 µl de IPTG y se incubaron toda la noche a 37°C.

3.10. Selección de clones recombinantes

Las colonias crecidas en las placas LB tras 24 h de incubación adquirieron fenotipos diferentes según se hubiese ligado o no el inserto al plásmido. Las colonias de color azul estaban formadas por células transformadas cuyo gen *lacZ-α* era funcional. Las colonias blancas, en cambio, estaban constituidas por clones recombinantes en las cuales el amplicón se había insertado correctamente en la zona de clonaje múltiple del vector interrumpiendo así el gen *lacZ-α*. Con puntas estériles, se tocó la superficie de la colonia blanca para resembrarla en un tubo de caldo LB suplementado con los antibióticos correspondientes, para así obtener más cantidad de células recombinantes.

3.11. Extracción y purificación de DNA plasmídico

Para extraer el DNA plasmídico de las células Novablue Singles (Novagen) se siguió el protocolo NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit de Macherey-Nagel (Düren, Germany).

Para comprobar la presencia del inserto en el DNA obtenido se procedió a digerir una muestra con los enzimas de restricción utilizados en el clonaje y tras la digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.12. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes

Tras comprobar la presencia del inserto de interés en el vector se transformaron células Tuner (DE3) pLac (Novagen) con el plásmido recombinante. La metodología seguida para la transformación de esta cepa fue la misma que la seguida en el caso de la cepa Novablue Singles. En este caso las células se sembraron en placas de agar LB suplementadas con carbenicilina (50 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml).

3.13. Expresión de la proteína Kre9

Primero se creció la cepa que contenía la proteína Kre9 recombinante en 5 ml de caldo LB, 5 µl de carbenicilina (50 µg/ml) y 5 µl de cloranfenicol (34 µg/ml). Se incubó 24 h a 37°C en agitación.

Se inoculó 1 ml de la muestra en 100 ml de caldo LB, 100 µl de carbenicilina (50 µg/ml) y 100 µl de cloranfenicol (34 µg/ml). Se volvió a incubar 24 h a 37°C en agitación.

Al día siguiente se inocularon estos 100 ml de muestra en 2 l de caldo LB y se incubaron a 37°C en agitación durante 3 h. Tras este tiempo se añadieron 2 ml de IPTG (1 mM) y se incubó la mezcla 3,5 h a 37°C también en agitación. Tras el periodo de incubación, la muestra se centrifugó mediante un rotor JLA 91000 en una centrífuga del tipo Beckman 1 durante 10 min a 5000 rpm y 4°C. Se retiró el sobrenadante y se

resuspendieron las pastillas correspondientes a 500 ml de muestra cada una en 10 ml de tampón fosfato salino (PBS). Se centrifugaron las muestras otros 10 min a 5000 rpm en tubos de tamaño más pequeño para su mejor almacenamiento, se retiró el sobrenadante y la pastilla se almacenó a -20°C.

3.14. Extracción y purificación de proteínas recombinantes

Se resuspendió el pellet correspondiente a 500 ml de muestra en 5 ml de tampón Tris salino (TBS), 1,8 g de urea (6 M) y 100 µl de detergente tritón X-100. Se agitó la mezcla durante 20 min a temperatura ambiente y se sonicó durante 5 min con pulsos de 2 s (amplitud 40). Por último la muestra se centrifugó 10 min a 5000 rpm. Se repitió el proceso de sonicación y centrifugado cuando fue necesario para conseguir romper todas las células. De esta manera, las proteínas contenidas en la fracción soluble se separaron de los restos celulares contenidos en el pellet. Se guardó el sobrenadante para su purificación mediante columna de afinidad.

La proteína de fusión que surge tras la inserción de la proteína de *Candida* en el vector pET-Blue (Novagen) contiene una cola de 6 histidinas, la cual confiere a la proteína afinidad por columnas que contengan iones Níquel en la composición de su resina. Se emplearon las columnas HisTrap FF Crude 1ml (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) para la purificación de nuestra proteína recombinante. La preparación de la columna se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el suministrador del kit. En el procedimiento se emplearon una serie de tampones que se fueron añadiendo de manera secuencial a través de la columna para que primero se quedara retenida la proteína en la resina de manera específica y luego se eluyera por la adición de elevadas concentraciones de Imidazol en el tampón de elución. El Imidazol posee más afinidad por la columna y, por tanto, la proteína finalmente se eluyó en el tampón de elución.

Se recogió el tampón de elución y se pasó a una membrana para su diálisis. La diálisis se llevó a cabo a 4°C durante 24 h y durante este tiempo se realizaron varios cambios con agua destilada. Finalmente se recogió el contenido de la membrana en un bote y se congeló 30 min a -80°C. Por último, se puso la muestra a liofilizar durante toda una noche. El líofilo se resuspendió en 1 ml de PBS libre de endotoxinas 0,4 M NaCl.

3.15. Detección de la proteína recombinante Kre9 mediante Western Blotting

Una vez purificada, la proteína Kre9 fue analizada mediante electroforesis en SDS-PAGE según el método de Laemli (1970) en el sistema Miniprotein II (Bio-Rad) durante 45 min a 70 mA, 100 W y 200 V. Para la determinación de los pesos moleculares de las bandas obtenidas en la electroforesis se utilizaron como marcadores de peso molecular los Precision Plus Protein Dual Color (Bio-Rad). El gel se tiñó con el colorante azul de Coomassie G250 (Bio-Rad) durante 1 h y se destiñó con solución de desteñido (45% metanol, 10% ácido acético) mediante varios lavados de 5 min cada uno.

En paralelo, se realizó un Western Blot para la inmunodetección de la proteína de interés con el anticuerpo monoclonal HSV-Tag (Novagen). Esto es posible ya que la proteína recombinante presenta una cola HSV, la cual confiere actividad antigénica a la misma.

Para realizar el Western Blot, las proteínas fueron primero separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida por su peso molecular. Las proteínas fueron después transferidas por capilaridad a una membrana de nitrocelulosa. La membrana previamente humedecida con metanol y agua miliQ se mantuvo durante 10 min en TBS antes de comenzar las incubaciones. Después se bloquearon los radicales libres con TBSL (tampón TBS 5% leche descremada) durante 50 min en agitación. Tras ello, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario (HSV-Tag) en una dilución 1/10000 en TBSL durante 1 h en agitación. Posteriormente se realizaron 2 lavados de 5 min con TBS y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (anti-IgG) diluido 1/80000 en TBSL 30 min. Por último, las membranas fueron lavadas durante 5 min dos veces con TBS y visualizada la reacción mediante quimioluminiscencia a través del kit Amersham ECL Primer Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) en el aparato G:BOX (Syngene). Todas las incubaciones se llevaron a cabo a T^a ambiente.

En algunos casos se empleó el protocolo Microcon Centrifugal Devices (YM 3) (Millipore, Billerica, MA, USA) para concentrar la proteína y de esta manera poder detectarla mediante Western Blotting.

3.16. Eliminación de endotoxinas

Es importante retirar las endotoxinas que puedan estar acompañando a la proteína purificada ya que estas pueden interferir en el resultado de ensayos posteriores. Para retirarlas, se añadieron 150 μ l de agarosa-polimixina al liófilo.

Previamente se tuvo que limpiar la polimixina. Para ello se recogieron 1,5 ml de agarosa-polimixina en un eppendorf libre de endotoxinas. Se centrifugó 90 seg a 11000 g y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 750 μ l de PBS libre de endotoxinas 0,4 M NaCl y se volvió a centrifugar. El proceso se repitió una vez más. Finalmente se resuspendió la polimixina en 750 μ l de PBS libre de endotoxinas 0,4 M NaCl.

Después de añadir los 150 μ l de agarosa-polimixina, se dejó incubando durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. A continuación, se filtró la muestra (limpiar el filtro con PBS libre de endotoxinas 0,4M NaCl) y se recogió en un eppendorf libre de endotoxinas.

3.17. Cuantificación de proteínas

Para comprobar la concentración de proteína que se tenía antes y después del proceso de retirada de endotoxinas, se hizo una medida de concentración de la proteína Kre9.

Para realizar la medida de proteínas empleamos el kit BCA Protein Assay de Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA). Según esto, se preparó una recta patrón a partir de una proteína de concentración conocida. Se añadieron una serie de reactivos tanto a las muestras de la recta patrón como a las muestras de la proteína de interés para que de este modo alcanzaran diferentes valores de absorbancia según la concentración de proteína que tuviese cada muestra. Finalmente comparamos los valores de absorbancia de nuestra proteína con los valores de absorbancia de la proteína de concentración conocida, para así extrapolar la concentración de nuestra proteína. Los valores de absorbancia fueron medidos mediante espectrofotómetro.

3.18. Cuantificación de endotoxinas

Por otro lado, para comprobar que habíamos retirado las endotoxinas hasta valores que ya no pudiesen interferir con otros experimentos, también se realizó una medida de concentración de endotoxinas.

Para ello se empleó el protocolo Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA). En este caso también realizamos una recta patrón a partir de una muestra de endotoxinas de concentración conocida. Se añadieron una serie de reactivos para que cada muestra absorbiera una cantidad de luz diferente según la cantidad de endotoxinas que tuviera. Esto fue calculado mediante espectrofotómetro. Por último se realizó una curva estándar comparando la absorbancia de cada muestra con su concentración en EU/ml.

4. Resultados

4.1. Obtención del inserto de DNA mediante PCR

La secuencia nucleotídica de la proteína Kre9 que se amplificó mediante PCR consta de 834 pb. Para la visualización de la secuencia amplificada se realizó la separación de la muestra de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 3).

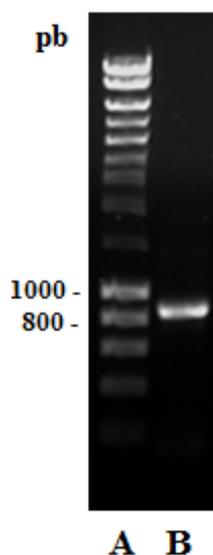


Figura 3. A: marcador de tamaño para gel de DNA. B: secuencia nucleotídica correspondiente a la amplificación mediante PCR del gen Kre9

4.2. Clonación de DNA de *C. albicans*

El vector de clonación y expresión que se empleó en este proceso fue el plásmido comercial pETBlue-2 (Novagen). Para empezar, el vector pETBlue-2 y el amplificado del gen de la proteína Kre9 fueron digeridos mediante las endonucleasas de restricción EcoRI y PstI. Una vez hecho esto se llevó a cabo la reacción de ligación de dichos fragmentos mediante el enzima T4-DNA ligasa. La secuencia se introdujo en el plásmido respetando la pauta de lectura del mismo, con lo que la proteína recombinante se expresó con la cola HSV-His. En la Figura 4 se pueden observar mediante

electroforesis en SDS-PAGE los tamaños pertenecientes al plásmido circular sin digerir, al plásmido lineal digerido mediante los enzimas de restricción y a la construcción pETBlue-Kre9 resultante del proceso de ligación.

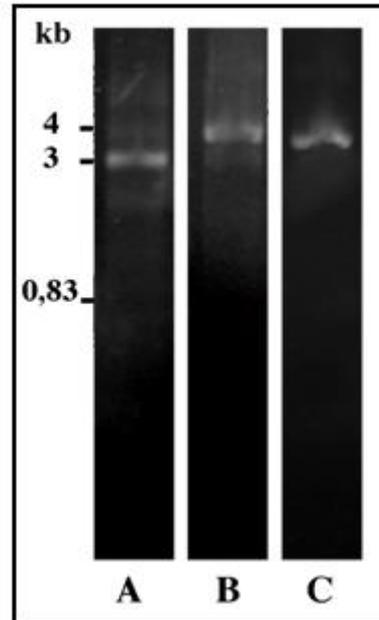


Figura 4. A: vector pETBlue circular. B: vector pETBlue digerido con enzimas de restricción. C: constructo pETBlue-Kre9 ligado

Se emplearon las células competentes Novablu Singles (Novagen) para llevar a cabo la transformación de las mismas con el plásmido y posterior selección de las células recombinantes según su fenotipo.

Se eligieron las colonias blancas como clones recombinantes y con ellas se hizo una preparación de DNA plasmídico y digestión con sus respectivos enzimas de restricción para comprobar el tamaño del inserto.

4.3. Expresión de la proteína recombinante Kre9

Para expresar la proteína Kre9, se introdujo el plásmido recombinante en las células Tuner (DE3) pLac (Novagen). Su expresión se analizó mediante geles de SDS-PAGE y Western Blot.

Como se puede observar en la Figura 5, la purificación mediante cromatografía de la proteína recombinante resultó satisfactoria ya que se pudo comprobar su presencia mediante tinción azul de Coomassie y mediante Western Blot utilizando el anticuerpo anti-HSV.

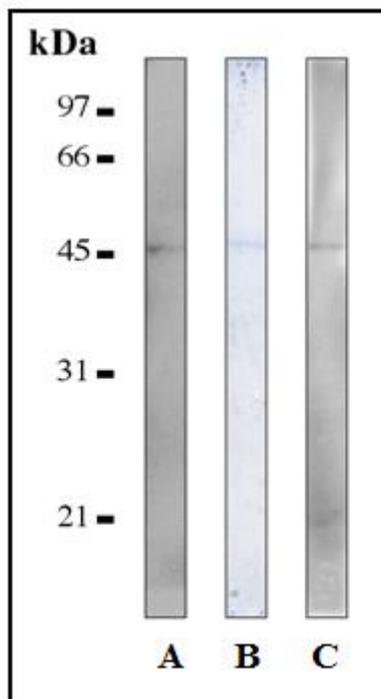


Figura 5. A: Western Blot del extracto de *E.coli* y Kre9 antes de purificar detectado mediante el anticuerpo anti-HSV. B: Electroforesis en SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie del extracto proteico de *E. coli* tras ser purificada la proteína Kre9. C: Western Blot de la proteína recombinante Kre9 después de ser purificada detectada mediante el anticuerpo anti-HSV.

4.4. Cuantificación de proteínas y endotoxinas

Tras purificar la proteína recombinante Kre9 retiramos las endotoxinas que pudiesen estar contaminando la muestra mediante tratamiento con polimixina-agarosa. Después de esto, realizamos una medida de la concentración de proteína y endotoxinas que tenía la muestra. Los resultados aparecen reflejados en las siguientes figuras.

Primero, se llevó a cabo una medida de la concentración de la proteína Kre9 antes de que esta fuera tratada con agarosa-polimixina para retirarle las endotoxinas (Figura 6). Partíamos de una concentración de 0,092 mg/ml de proteína en este punto del proceso.

A continuación, realizamos otra medida una vez tratada la muestra con agarosa-polimixina (Figura 7). Este procedimiento redujo la concentración de la proteína a 0,061 mg/ml.

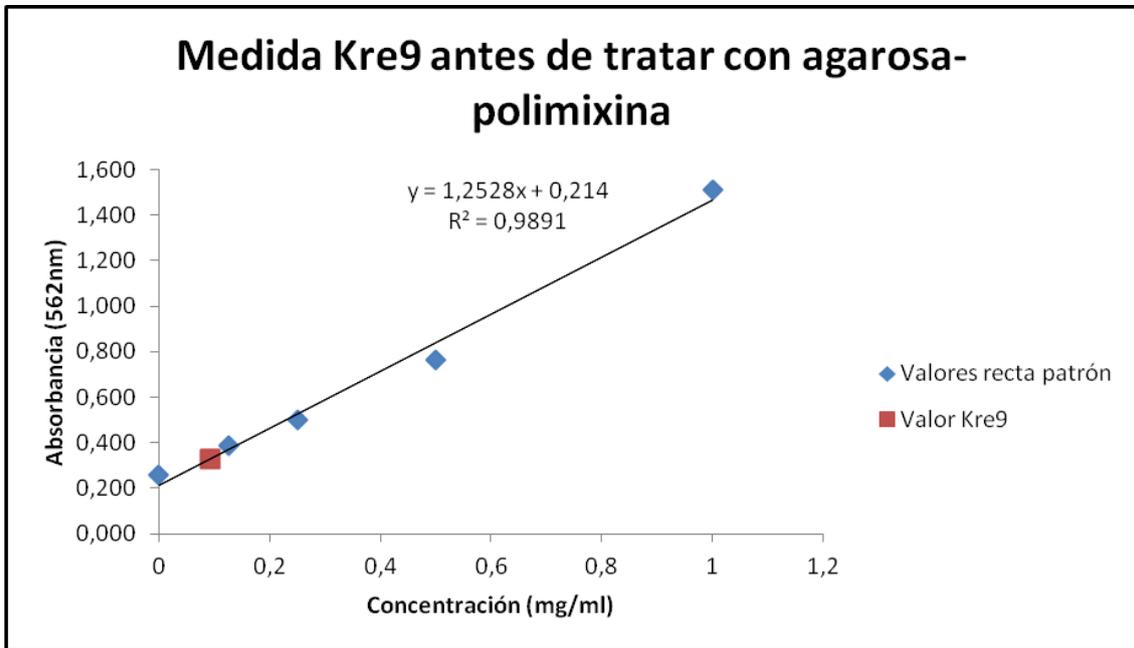


Figura 6. Medida de Kre9 mediante protocolo BCA Protein Assay antes de ser tratada con agarosa-polimixina. La concentración de la proteína se calculó mediante ecuación de la recta patrón

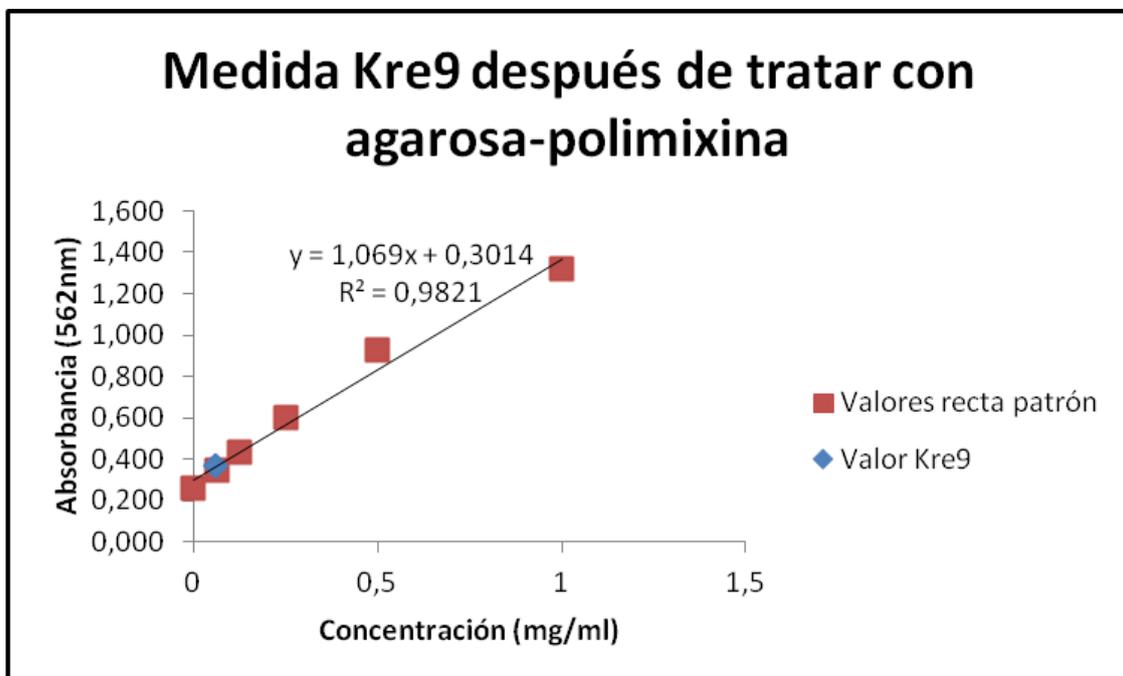


Figura 7. Medida de Kre9 mediante protocolo BCA Protein Assay después de tratamiento con agarosa-polimixina. La concentración de la proteína se calculó mediante ecuación de la recta patrón

Por último, se realizó una medida de las endotoxinas que presentaba la muestra mediante el protocolo Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Figura 8). Según esto, la muestra de la proteína Kre9 purificada y posteriormente tratada con agarosa-polimixina presentaba una concentración final de 0,374 EU/ml de endotoxinas en su muestra. Este valor es alto, pero entra en el rango permitido para realizar pruebas posteriores con la muestra de Kre9 purificada.

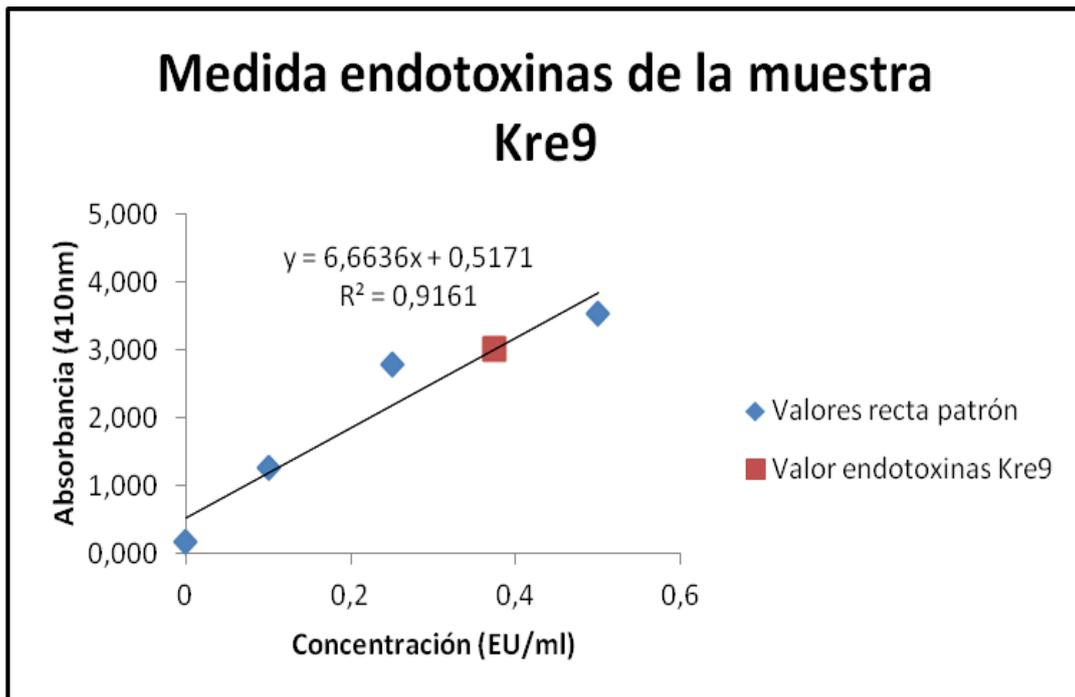


Figura 8. Medida de las endotoxinas de la muestra Kre9 mediante protocolo Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit después de tratamiento con agarosa-polimixina. La concentración de las endotoxinas se calculó mediante ecuación de la recta patrón

5. Discusión

Candida albicans es un hongo dimórfico que, en individuos con el sistema inmunitario debilitado, es capaz de manifestarse como patógeno oportunista y causar infecciones conocidas por el nombre de candidiasis.

Nuestro grupo ha concluido, tras muchos años de investigación, que *C. albicans* favorece el desarrollo de metástasis en el hígado mediante la activación de un proceso inflamatorio en las células endoteliales (Rodríguez-Cuesta *et al.*, 2010, Ramirez-Garcia *et al.*, 2011; Ramirez-Garcia *et al.*, 2013). Cuando se desarrolla una infección hematógena, el primer lugar donde se retienen los microorganismos es la línea de células endoteliales de la red vascular. Cuando se estimula el endotelio en respuesta a *C. albicans* se induce una cascada de producción de citocinas, la cual a su vez incrementa la producción de moléculas de adhesión tales como la VCAM-1. Es posible que las células tumorales se adhieran entonces a estas moléculas, favoreciendo así el proceso de metástasis.

Más recientemente, se ha relacionado este efecto con una fracción enriquecida en manoproteínas, algunas de las cuales se han identificado para su posterior estudio individualizado (Ramirez-Garcia *et al.*, 2011). Los mecanismos moleculares implicados en el incremento de la adhesión de células tumorales inducido por estas fracciones manoproteicas todavía no se conocen muy bien, pero es posible que el receptor de manosa, entre otros, pueda estar estimulado por algún componente de estas proteínas manosiladas (Ramirez-Garcia *et al.*, 2013).

La proteína Kre9 es una manoproteína O-glicosilada situada en la pared celular de *C. albicans* que interviene en la síntesis de β -1,6-glucanos (Lussier *et al.*, 1998). El peso molecular estimado de su parte proteica es de 29.126 kDa y su punto isoeléctrico de 8.29, pero aparece a una altura de unos 55 kDa cuando se estudia en conjunto con su parte azucarada (Lussier *et al.*, 1998). Esto es así porque, como es lógico, la parte azucarada aumenta el peso molecular de la proteína. La manoproteína Kre9, aunque no fue identificada entre las proteínas más abundantes, tanto por su peso molecular como por su punto isoeléctrico, pertenece a la fracción manoproteica que ha sido identificada como la más activa en la inducción del aumento de la adhesión tumoral al endotelio

(Ramirez-Garcia *et al.*, 2011). Es por esto que en este trabajo se ha decidido trabajar con ella.

Se consiguió amplificar el gen de la proteína Kre9 mediante PCR convencional, como pudimos comprobar a través de una electroforesis en gel de agarosa. De esta manera conseguimos una mayor concentración del DNA del que partíamos. Este paso del trabajo era crucial para una posterior clonación del gen.

Una vez hecho esto, nos dispusimos a introducir el inserto en el vector comercial pETBlue (Novagen). Para ello, digerimos tanto el plásmido como el amplificado con dos endonucleasas de restricción. Realizar la digestión con dos enzimas de restricción en un principio puede parecer desventajoso ya que requiere de más material y un proceso algo más complejo pero, por otro lado, presenta un beneficio evidente. Al digerir el vector con dos enzimas de restricción se evita que en el proceso de ligación ocurran recircularizaciones del vector consigo mismo, o concatenaciones de varios insertos. Además, digerir tanto el inserto como el vector con dos enzimas, a su vez, favorece que el gen de la proteína Kre9 se inserte en el plásmido en la pauta de lectura correcta. Esto permite que la proteína de fusión se forme correctamente y presente como características propias una cola His para su correcta purificación y una cola HSV para su inmunodetección mediante anticuerpos específicos.

Se emplearon primero las células competentes Novablue Singles (Novagen) para los experimentos de transformación ya que estas aseguran una elevada eficiencia de transformación y un elevado número de copias de plásmido. Para la expresión de la proteína, en cambio, se transformaron las células Tuner (DE3) pLac (Novagen) con el plásmido recombinante previamente seleccionado y extraído de las células Novablue. En las células Tuner se puede regular la cantidad de expresión de la proteína deseada mediante la concentración del inductor IPTG que se le añade al medio de cultivo de las mismas. Es por esto que la expresión de la proteína Kre9 la llevamos a cabo en este tipo de células.

Una vez expresada y purificada la proteína Kre9, realizamos una serie de comprobaciones mediante técnica de Western Blot y mediciones de la concentración de proteína y endotoxinas de la muestra para comprobar que el proceso se había llevado a cabo correctamente.

Por un lado, realizamos un Western Blot antes y después de la purificación de la proteína Kre9. Los resultados muestran que la proteína no se perdió durante el proceso de purificación, a pesar de que muy posiblemente su concentración se viera reducida tras esta fase. Por otro lado, se comprobó que el proceso de purificación se había realizado correctamente ya que se realizó una electroforesis en SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie y la única proteína que se visualizaba en el gel era la Kre9.

Se realizó posteriormente un tratamiento con agarosa-polimixina sobre la muestra de la proteína Kre9 purificada para retirar las endotoxinas que la pudiesen estar contaminando. Una endotoxina es un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas constituida por polisacáridos y lípidos. Estas endotoxinas se liberan de la bacteria estimulando diversidad de respuestas inmunes, como por ejemplo secreción de citocinas, expresión de moléculas de adhesión en el endotelio, etc. Las respuestas que inducen las endotoxinas influirían directamente en futuros ensayos que se quieran hacer con la proteína Kre9 purificada para conocer su implicación en la adhesión de células tumorales al epitelio sinusoidal hepático, por lo que el tratamiento con agarosa-polimixina para su eficiente retirada fue crucial para dar por concluido el trabajo.

Las medidas de proteínas que se realizaron antes y después de retirar las endotoxinas de la muestra indican que se pierde alrededor del 30% de la proteína al tratarla con polimixina-agarosa. Se hicieron varias pruebas para intentar ajustar el protocolo de tal manera que se perdiese la mínima cantidad posible de proteína. Finalmente, el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos fue el más rentable, a pesar de que aún así solo se consigue recuperar 2/3 de la concentración inicial.

También se calculó la concentración de endotoxinas en EU/ml que presentaba la muestra después de haberla tratado con agarosa-polimixina. Esto demostró que el protocolo descrito no consigue retirar las endotoxinas por completo, pero desciende la concentración final de endotoxinas a valores más bajos, que entran en el rango permitido para realizar futuros ensayos con la proteína Kre9 purificada durante este trabajo.

Para concluir el trabajo, cabe destacar que la clonación de la proteína Kre9 da pie a futuras investigaciones para analizar los mecanismos metastásicos afectados, tales como el aumento de la adhesión tumoral inducido. Además, próximamente se podrán producir

anticuerpos monoclonales contra esta proteína para estudiar sus efectos inhibitorios. Un estudio meticuloso del efecto de esta y otras manoproteínas podría ayudar a identificar nuevas dianas terapéuticas que pudiesen proteger a los pacientes de cáncer frente a una infección por *Candida*.

6. Bibliografía

Anttila VJ, Ruutu P, Bondestam S, Jansson SE, Nordling S, Färkkilä M, Sivonen A, Castren M, Ruutu T (1994) Hepatosplenic yeast infection in patients with acute-leukemia-a diagnostic problem. *Clin Infect Dis* 18:979-981

Ashman RB, Papadimitiou JM (1995) Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* Infection. *Microbiol. Rev.* 59: 646-672.

Asumendi A, Alvarez A, Martinez I, Smedsrod B, VidalVanaclochoa F (1996) Hepatic sinusoidal endothelium heterogeneity with respect to mannose receptor activity is interleukin-1 dependent. *Hepatology* 23:1521-1529

Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP (1999) Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis, *Clin Infect Dis.* 29:239-244.

Filler SG, Pfunder AS, Spellberg BJ, Spellberg JP, Edwards Jr JE. *Candida albicans* stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect Immun.* 1996; 64:2609-2617.

Lussier M, Sdicu A-M, Shahinian S, Bussey H. (1998) The *Candida albicans* KRE9 gene is required for cell wall β -1,6-glucan synthesis and is essential for growth on glucose. *Proc Natl Acad Sci* 95: 9825-9830

Orozco AS, Zhou X, Filler SG (2000) Mechanism of the proinflammatory response of endothelial cells to *Candida albicans* infection. *Infect Immun* 68:1134-1141

Ramirez-Garcia A, Arteta B, Abad-Diaz-de-Cerio A, Pellon A, Antoran A, *et al.* (2013) *Candida albicans* increases Tumor Cell Adhesion to Endothelial Cells In Vitro: Intraspecific Differences and Importance of the Mannose Receptor. *PLoS ONE* 8(1): e53584. doi:10.1371/journal.pone.0053584

Ramirez-Garcia A, Gallot N, Abad A, Mendoza L, Rementeria A, *et al.* (2011) Molecular fractionation and characterization of a *Candida albicans* fraction that increases tumor cell adhesion to hepatic endothelium. *Appl Microbiol Biotechnol* 92: 133-145.

Rodríguez-Cuesta J, Hernando FL, Mendoza L, Gallot N, de Cerio AA, *et al.* (2010) *Candida albicans* enhances experimental hepatic melanoma metastasis. *Clin Exp Metastasis* 27: 35-42.