

Ras Regulación de la Polarización de Actina en *Cryptococcus Neoformans*

Martínez Ramos¹, Jaimes Víctor², Arturo Elina³

¹Facultad de Biología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador

²Facultad de Microbiología, University of Cuenca, Ecuador

³Facultad de Microbiología, Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Abstracto

Los mecanismos por los cuales las células detectan y se adaptan a los cambios en el entorno están mediados por vías de transducción de señales conservadas que acoplan señales extracelulares específicas a salidas celulares definidas. Las proteínas Ras son reguladores conservados de las vías de transducción de señales que median cambios adaptativos, como el desarrollo celular y la morfogénesis.

Palabras clave: *Cryptococcus Neoformans*, Morfogénesis, Polarización de Actina

1. Introducción

Los mecanismos por los cuales las células perciben y se adaptan a los cambios en el medio ambiente están mediados por vías de transducción de señales que se acoplan a células extracelulares específicas a salidas celulares definidas. Proteínas Ras son reguladores conservados de las vías de transducción de señales que median cambios adaptativos, como el desarrollo celular y morfogénesis [1]. En mamíferos sistemas, Ras controla la proliferación celular y bien caracterizada las mutaciones en estas proteínas están asociadas con transformación maligna y descontrolado crecimiento [2]. En microorganismos, proteínas Ras están igualmente involucrados en la regulación del crecimiento y desarrollo. Las proteínas Ras1 y Ras2 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, juega un papel central en el control de los niveles de AMPc y la señalización de MAP quinasa, y regulan ambos diploides crecimiento pseudohifal y haploide crecimiento invasivo [3]. Más recientemente, Ras2 también se ha demostrado que regula la polarización de la citoesqueleto de actina. En la levadura, *Schizosaccharomyces pombe*, Ras no aparece participen en la homeostasis de cAMP. En cambio, *Sch. Pombe* Ras1 controla la actividad de la feromona vía de respuesta y apareamiento [4].

Los microorganismos patógenos deben poder adaptarse a cambios dramáticos a medida que se mueven del medio ambiente en el host infectado. En estos organismos, lo mismo vías de señalización que se utilizan para detectar cambios en el medio ambiente también puede usarse para regular los determinantes de virulencia e infección del huésped. Por lo tanto, los patógenos pueden ser sistemas modelo excelentes para diseccionar el control genético de la adaptación y el desarrollo celular. Además de definir los mecanismos de patogénesis [5].

Cryptococcus neoformans es un patógeno fúngico humano que causa principalmente una meningoencefalitis en huéspedes con sistemas inmunes deteriorados. Hemos usado este levadura basidiomicetos como sistema modelo para diseccionar vías de transducción de señales que controlan el desarrollo de hongos y patogenicidad [6]. Anteriormente, demostramos que una proteína conservada de *C. neoformans* Ras era requerido para el crecimiento de esta levadura a 37 ° C y por lo tanto para virulencia. La proteína Ras1 es también se requiere para el apareamiento y la activación de una feromona sensor. La cascada de señalización de MAP quinasa puede suprimir el defecto de apareamiento mutante *ras1*. Esta observación y aclaración de una señal Ras similar vías de transducción en organismos como la gemación levadura y levadura de pasión, sugieren que *C. neoformans* Ras1 actúa aguas arriba de una respuesta de feromona} MAP quinasa vía de señalización para controlar el apareamiento. En contraste, MAP Los elementos de señalización de quinasa no suprimen el *ras1* defecto de crecimiento mutante a alta temperatura, lo que indica que Ras1 regula el crecimiento vegetativo a 37 ° C a través de un segundo vía [7].

2. Metodos

Para comprender mejor los mecanismos moleculares de Ras señalizando en *C. neoformans*, identificamos un segundo RAS gen en este organismo. El gen RAS2 se expresa en un nivel muy bajo y no fue inducido bajo varias diferentes condiciones in vitro o por interrupción de la Gen RAS1. El gen RAS2 fue interrumpido por la transformación y recombinación homóloga [8]. mutante *ras2* las cepas fueron viables y no mostraron fenotipo fenotípico significativo alteraciones de tipo salvaje in vitro o en un animal modelo de enfermedad criptocócica. Sobreexpresión de la El gen RAS2 en un fondo mutante *ras1* suprimió *ras1* fenotipos mutantes, lo que indica que Ras1 y Ras2 Las proteínas comparten cierto grado de redundancia funcional. Análisis de los fenotipos terminales

del mutante ras1 cepaincubada a 37 ° C, así como la complementación de estos fenotipos por sobreexpresión de RAS2, Sugerir un papel conservado de Ras en la regulación de crecimiento fúngico, así como una posible conservación de la objetivos aguas abajo de las vías Ras en *C. neoformans*[9].

Todas las cepas utilizadas en este estudio (excepto la cepa JEC20) son cepas de serotipo A *C. neoformans* derivadas de cepa de tipo salvaje H99. LCC1 es un ras1 cepa mutante y H99-ura5 y Los LCC70 son resistentes al ácido 5-fluorouracilo (5-FOA) espontáneamente derivados de H99 y LCC1, respectivamente, creados por el método de Kwon-Chung. LCC3 es un mutante ras1 cepa en la que se ha reintroducido el gen RAS1 de tipo salvaje. MWC12 y MWC13 son mutantes ras2 cepas y MWC14, MWC15 y MWC16 son ras1 ras2 cepas mutantes dobles, todas descritas en este estudio[10]. Presión MWC17 se construyó reintroduciendo el RAS1 de tipo salvaje gen vinculado al gen hph que confiere resistencia a la higromicina B en la cepa MWC14 por transformación biolística usando el método descrito anteriormente. La transformación biolística se utilizó para integrar el gen RAS2 bajo control del promotor GPD1 en el tipo salvaje RAS1 cepa H99-ura5 para crear la cepa RAS1RAS2 MWC27 y en la cepa mutante ras1 LCC70 para crear las cepas ras1RAS2 MWC28 y MWC29. JEC20 es un cepa de tipo salvaje de serotipo D utilizada para los experimentos de apareamiento. Se usaron medios de levadura estándar para la mayoría de los experimentos. Agar de semillas de Níger y Medio de apareamiento V8 y no iron medio (bajo contenido en hierro medio 56 IM EDDHA) se prepararon como se describió anteriormente[11].

A menos que se indique lo contrario, todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp 9600 con 50 ng de plantilla de ADN, 100 ng de cada cebador oligonucleotídico y reactivos estándar del kit TaKaRa (Takara Shuzo)[12].

3. Análisis de Los Datos

Para identificar la codificación del gen un segundo homólogo Ras (RAS2), los cebadores degenerados fueron sintetizados en base a regiones de homología entre varios genes RAS fúngicos: cebador 1907 (5' «-CTCGAGCTCGARTAYGAYACYATYG- 3' «) y primer 1908 (5' « - CAGCTGCAGTAYTCYTCYTCGRCCRGCRGTRTC- 3' «) (Y = pirimidina, R = purina). Se amplificó un fragmento de 115 nt usando estos cebadores en una reacción de PCR con ADNc de la cepa H99 como plantilla con las siguientes condiciones: 94 ° C durante 5 min. seguido de 35 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 40 ° C durante 60 s, 72 ° C por 30 s[13].

El fragmento RAS2 de 115 nt se usó para sondear un genómico Southern blot de la cepa de ADN H99. Para todas las hibridaciones del sur, electroforesis, transferencia de ADN, prehibridación, hibridación y autoradiografía se realizaron como se describe por Sambrook. Las sondas se etiquetaron usando el kit de etiquetado de ADN preparado al azar (Boehringer Mannheim) y [³²P] dCTP (Amersham). Un fragmento SacI de 2 ± 6 kb que contiene todo el locus genómico RAS2 fue aislado por cribado de una biblioteca subgenómica de fragmentos SacI (2 ± 3 kb) de ADN genómico H99 en el plásmido Bluescript SK (Stratagene) por hibridación de colonias usando el fragmento de 115 nt como sonda. La alineación con otras proteínas Ras se realizó utilizando el programa align (DNASTar)[14].

El ADNc de RAS2 se amplificó a partir de una biblioteca de ADNc de cepa H99 usando los siguientes cebadores: 5064 (5' «-CCTCAACCCACACCCACACC- 3' «) y 5067 (5' « - GCCAACTTGATCTTCTTACC- 3' «). El fragmento de PCR resultante fue secuenciado y comparado con la secuencia genómica H99 RAS2.

los ras2D:: el alelo mutante URA5 fue creado por superposición de PCR extensión utilizando el método de Ho. Los 5' «y 3' « Los fragmentos RAS2 se amplificaron por PCR usando el gen RAS2 como plantilla y los siguientes cebadores: 5' «fragmento RAS2 cebadores 4549 (5' «-CGAAGCCAACGTCCTCGCC-3' «) y 4550 (5' «-GCAGTAAGCGATCTTTGAACGATTCTACGAAGCGAGCGC- 3' «) (secuencia URA5 subrayada); 3' «RAS2 cebadores de fragmentos 4551 (5' «-CCCACCTCCTGGAGGCAAGCCGCGCAGTGCC- GTGTATTCC-3' «) (secuencia URA5 subrayado) y 4552 (5' «-CCTCGAGATTCTCCACGCTGC- 3' «). Se agregó la secuencia RAS2 al gen URA5 por PCR usando el plásmido pCnTel como plantilla (Edman, 1992) y los siguientes cebadores: 4553 (5' «-GCGCTCGCTTCGTAGAATCGTTCAAAGATCGCT- TACTGC-3' «) y 4554 (5' «-GGAATACACGGCAGTGCGCGGCTTGCTCCAGGAGGTGGG- 3' «) (secuencia RAS2 subrayada). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 94 ° C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 50 ° C durante 1 min y 72 ° C durante 2 min. Los fragmentos lineales obtenidos de cada una de las tres PCR las reacciones se usaron juntas como plantilla en una reacción de PCR con cebadores de oligonucleótidos 4549 y

4552 y los siguientes condiciones: 94 ° C por 5 min seguido de 35 ciclos de 94 ° C por 30 s, 50 ° C durante 30 s y 72 ° C durante 3 min. Un fragmento de 3 ± 5 kb representando el ras2D:: Se obtuvo el alelo URA5.

El ras2D lineal, dideoxy-tailed:: construcción de disrupción URA5 fue transformado en cepas H99-ura5 y LCC70 por biolistic Entrega de ADN, y los transformantes fueron seleccionados en un medio sintético que carece de uracilo con sorbitol 1 M como se describe en Toffaletti y col. Los transformantes fueron seleccionados usando PCR para identificar mutantes putativos ras2. ADN genómico fue aislado de 36 transformantes para cada cepa de partida por el método de Pitkin y utilizado como plantilla para una Reacción de PCR utilizando el cebador RAS2-speci@c 5150 (5' «- CCATCTCATCTCATCACAACAGG-3'») y el URA5- speci@c primer 5151 (5' «- CGTCTTCTTCATCTAGTCGG-3'») para identificar cepas en las cuales una interrupción específica del tipo salvaje se produjo locus RAS2. Las condiciones de PCR fueron 94 ° C durante 5 min seguido de 35 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 50 ° C para 30 s y 72 ° C durante 1 min. Se anticipó un fragmento de 1 ± 2 kb en aquellas cepas en las que el gen RAS2 de tipo salvaje había sido reemplazado por el ras2D: alelo URA5 por recombinación homóloga. Para evaluar el supuesto mutante ras2 y ras1 ras2 cepas mutantes dobles, la hibridación genómica Southern fue realizada usando ADN genómico aislado de cepas H99, LCC1, MWC12, MWC13, MWC14, MWC15 y MWC16 y digerido con EcoRI. Todo el locus RAS2 desde el principio. Para la terminación se utilizaron codones como sonda [15].

4. Resultados

Las cepas se preincubaron en Medio YPD durante 48 h a 25 ° C y posteriormente inoculadas en medio YPD. Los tiempos de duplicación de la fase exponencial fueron determinados mediante el cultivo cuantitativo de estas muestras cada 2 h por 18 h. Se analizaron muestras triplicadas para cada cepa y la significación estadística de las diferencias entre las cepas fue calculada utilizando una prueba t de Student emparejada.

La virulencia de las cepas mutantes ras1 y ras2 fue evaluada en el modelo de criptococosis por inhalación de ratón como descrito por Cox Brey, inmunocompetente los ratones fueron anestesiados e inoculados intranasalmente con 5 -10% de células C. neoformans. Animales infectados con patógenos. Las cepas murieron de meningoencefalitis fulminante. Los ratones fueron sacrificados antes de la muerte basados en puntos finales clínicos previamente correlacionados con la mortalidad. La supervivencia era determinada para 10 ratones infectados con el tipo salvaje, ras1 cepas mutantes o ras2 mutantes. La significación estadística de diferencias de supervivencia entre ratones infectados con diferentes cepas se evaluó utilizando el algoritmo de Kruskal ± Wallis.

Todas las cepas se cultivaron inicialmente durante 48 h en YPD medio a 25 ° C y suspendidas en agua a 10⁸ células ml⁻¹. Para cada cepa a ser probada, se mezclaron 5 ml de la suspensión celular con 5 ml de la suspensión celular de la cepa MATa JEC20 y plateado como una gota en agar apareamiento V8. Los parches de apareamiento eran incubados en la oscuridad a 25 ° C durante 14 días y microscópicamente evaluado diariamente por la aparición de hifas y otras estructuras de apareamiento.

Plásmido pRCD83, que contiene el C. promotor GPD1 de neoformans vinculado al URA5 seleccionable marcador, se obtuvo de Robert Davidson en la Universidad de Duke. El gen RAS2 fue clonado en este vector y bajo control del promotor GPD1, y esta nueva construcción fue transformada biolísticamente en la cepa ras1 ura5 LCC70 y la cepa RAS1 ura5 H99-ura5. Para el análisis del norte, total El ARN se extrajo de células de fase exponencial incubadas en Medio YPD como se describió previamente. Quince microgramos de ARN se cargaron en un formoldehído Gel de ARN y electroforesis, transferencia de ARN, hibridación y autorradiografía se realizaron según lo descrito por Sambrook y col.

Toda luz y fluorescencia La microscopía se realizó en un microscopio Nikon Optiphot-2 utilizando los filtros y objetivos apropiados. Las imágenes fueron capturadas y procesadas con la cámara digital Spot RT (Instrumentos de diagnóstico) con el software Adobe Photoshop. C. Las células de Neoformans se corrigieron añadiendo un cuarto de volumen de 37% de formaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Células luego se lavaron tres veces con PBS, permeabilizado por agregando 1% de Triton X-100 en PBS durante 5 minutos y lavadas tres veces con PBS. Para visualizar F-actina, alícuotas de células fijadas se incubaron con faloidina conjugada con rodamina (1:10 dilución de 10 µg ml⁻¹ stock) durante 2 h.

Se amplificaron dos fragmentos de ADN por PCR bajo baja restricción de condiciones usando ADNc de C. neoformans como plantilla y cebadores diseñados contra secuencias conservadas de genes RAS de diversos hongos. A 141 pb fragmento era idéntico en secuencia a C. neoformans Gen RAS1. Un distintivo 115 pb fragmento representaba un segundo gen RAS en C. neoformans eso era homólogo a genes RAS fúngicos, pero distinto de RAS1. Este fragmento más pequeño se usó para sondear una transferencia Southern de ADN genómico de la cepa H99 y un fragmento SacI de 2 ± 6 kb que abarcaba todo El locus RAS2 se aisló de una

biblioteca de tamaño seleccionado de ADN genómico H99 por hibridación de colonias. Iniciación y codones de terminación, así como los límites intrónicos de *C. neoformans* RAS2, se identificaron por alineación con otros homólogos de Ras, definiendo un locus genómico de 1097 nt con cuatro intrones. El *C. neoformans* RAS2 El ADNc se amplificó a partir de una biblioteca de ADNc H99 usando cebadores basados en el ORF RAS2 predicho y secuenciados para confirmar la región de codificación. El gen RAS2 codifica una proteína 238 aa que comparte una secuencia moderada identidad con *C. neoformans* Ras1 (37%). Es el más cercano homólogo es la proteína *Neurospora crassa* Ras2 (46%) (Fig. 1a). Sitios de unión a GTP conservados y un terminal C El motivo CAAX está presente.

Para determinar los roles biológicos de este segundo RAS proteína en *C. neoformans*, el gen RAS2 fue interrumpido por transformación biolística y recombinación homóloga. El gen *C. neoformans* URA5 sirvió como el marcador seleccionable (Fig. 1b) y una derivada *ura5* de la cepa de serotipo A H99 como receptor (H99-*ura5*). PCR amplificación reveló que el gen RAS2 fue reemplazado por el *ras2::* alelo de disrupción URA5 en 15 de 36 (42%) Ura + transformantes. Hibridación Southern confirmó que el gen de tipo salvaje había sido reemplazado con precisión por el alelo disruptivo sin integraciones ectópicas en dos de estos transformantes (MWC12, 13) (Fig. 1c). El en los fenotipos *in vitro* fueron idénticos para ambos mutantes *ras2* independientes.

En contraste con *Sac. cerevisiae*, en el que *ras1* y *ras2* las mutaciones son sintéticamente letales (Kataoka et al., 1984; Tatchell et al., 1984), *C. neoformans* *ras1 ras2* se encontró que los mutantes dobles son viables. Cepas en que los genes RAS1 y RAS2 fueron interrumpidos fueron construidos de manera similar al *ras2* solo mutantes al interrumpir el gen RAS2 en un derivado *ura5* de una cepa mutante *ras1* (LCC70). Veintiuno de 36 (58%) los transformantes *ras1* se identificaron por PCR en que el gen endógeno RAS2 había sido reemplazado por el *ras2::* alelo de disrupción URA5. Por Southern blot análisis, el gen RAS2 fue interrumpido y no ectópicas copias del alelo disruptivo estaban presentes entre cepas examinadas (MWC14, 15, 16).

El tipo salvaje (H99), mutante *ras1* (LCC1), *ras1*RAS1 reconstituido (LCC3), mutante *ras2* (MWC12, 13) y Las cepas *ras1 ras2* de doble mutante (MWC14, 15, 16) fueron incubados en medio YPD durante 48 h a 25, 37 y 39 ° C. Cepas de tipo salvaje, mutantes *ras1* y mutantes *ras2* Todos crecen bien a 25 ° C. Como se informó anteriormente, el la cepa mutante serotipo A *ras1* no pudo crecer a los 37 o 39 ° C (Alspaugh et al., 2000). En contraste, el *ras2* la cepa mutante creció tan bien como de tipo salvaje a todas las temperaturas, indicando que no se requiere RAS2 para el crecimiento a altas temperaturas.

Aunque los mutantes dobles *ras1 ras2* eran viables, todos tres cepas independientes exhibieron un defecto de crecimiento en todas las temperaturas probadas. Análisis microscópico de la cepa doble mutante *ras1 ras2* no reveló ningún discernimiento de cambios morfológicos en comparación con el tipo salvaje. Todas las etapas de gemación fueron aparentes y no hubo madre ± Se observaron anomalías en el cuello de la hija. Tamaño de celda de la cepa *ras1 ras2* fue similar a la de tipo salvaje.

5. Discusión

Para determinar si este fenotipo era atribuible a las mutaciones *ras1* y *ras2*, una prueba de complementación fue realizada. El gen RAS1 de tipo salvaje fue introducido en un mutante doble *ras1 ras2* representativo cepa (MWC14) y la tasa de crecimiento de fase exponencial en medio rico del *ras1 ras2*RAS1 reconstituido cepa (MWC17) se comparó con la de *ras1 ras2* doble mutante El tiempo de duplicación de *ras1 ras2* la cepa mutante doble disminuyó de 4 ± 25 a 2 ± 47 h ($P = 0.045$) cuando se reintrodujo el gen RAS1. Introducción del gen RAS1 en una cepa de tipo salvaje no afectó el tiempo de generación de las células de fase exponencial. Esta observación demuestra que la disminución de la tasa de crecimiento de la cepa mutante doble se debe a un efecto sintético de la mutación *ras1* y *ras2* y no a una mutación inducida por separado.

El tipo salvaje, mutante *ras1*, *ras1*RAS1 reconstituido y cepas mutantes *ras2* se incubaron en el apareamiento V8 medio durante 5 días en reacciones de apareamiento con el MAT cepa JEC20. Entre estas cepas, solo las cepas mutantes *ras1* mostraron un defecto de apareamiento significativo, como se señaló anteriormente (Alspaugh). A diferencia de, examen del borde de los parches de apareamiento para el apareamiento reveló que el mutante *ras2* cepa apareó normalmente. Por lo tanto, Ras1, y no Ras2, es el elemento Ras predominante que regula *C. neoformans* apareamiento.

Además, los mutantes *ras2* no exhibieron defectos en expresión *in vitro* de dos inducibles bien caracterizados factores de virulencia: cápsula y melanina. El tipo salvaje y cepas mutantes *ras2* se incubaron en semilla de Níger agar durante 72 h para evaluar la producción de melanina. Las cepas también se incubaron en medio sin hierro durante 4 días a 30 ° C y examinado por India preparación de tinta para evaluar la

cápsula producción. No hubo diferencia en melanina o inducción de la cápsula observada entre el tipo salvaje y cepas mutantes ras2. Del mismo modo, no hubo diferencia entre las cepas ras2 mutantes y de tipo salvaje en agar invasión o adhesión de agar (Alspaugh). El análisis microscópico no reveló defectos entre los ras2 cepas en la morfología celular o gemación.

Nuestros estudios anteriores revelaron que un *C. neoformans* ras1 la cepa mutante fue avirulenta en un modelo animal de meningitis criptocócica, probablemente debido a su incapacidad para crecer a temperatura fisiológica. Para probar la patogenicidad del mutante ras2 cepa, ratones inmunocompetentes fueron inoculados intranasalmente con tipo salvaje (H99), mutante ras1 (LCC1) o ras2 células mutantes (MWC12). En el modelo de inhalación murina de criptococosis, animales infectados con *C. virulenta* cepas de *neoformans* desarrollan meningoencefalitis criptocócica mortal. En este experimento, todos los animales infectados con la cepa de tipo salvaje sufrieron un resultado fatal a los 34 d (mediana de supervivencia 23 ± 5 d). En de acuerdo con nuestras observaciones anteriores, el ras1 cepa mutante fue completamente atenuada por virulencia en comparación con la cepa parental de tipo salvaje. Todos los animales infectado con la cepa mutante ras1 sobrevivió durante los 60 días del experimento ($P = 0 \pm 001$). En contraste, hay no hubo diferencias significativas en la supervivencia de los ratones infectado con la cepa mutante ras2 en comparación con aquellos infectados con la cepa de tipo salvaje. La mediana supervivencia de animales infectados con la cepa mutante ras2 fue de 25 ± 5 d, sin que el animal sobreviviera después de 35 d ($P = 0 \pm 113$). Por lo tanto, se requiere Ras1, pero no Ras2, para patogenicidad de *C. neoformans*.

La forma de levadura de *C. neoformans* es fenotípicamente similar a la levadura incipiente *Sac. cerevisiae*. El incipiente evento es acovegetativo. las células de *cerevisiae* están bien descritas y requiere una reorganización dramática de la actina citoesqueleto. La organización y dinámica del citoesqueleto de actina de *C. neoformans* es muy similar a eso en *Sac. cerevisiae*. F-actina se organiza en parches, cables y anillos, y la morfogénesis celular es dirigida por reorganización de actina y polarización.

Análisis microscópico del tipo salvaje (H99), ras1 mutantes (LCC1) y mutantes ras2 (MWC14) incubados durante 48 h a 25 y 37 ° C reveló sorprendente morfología cambios en el mutante ras1 incubado en la elevación temperatura. Cuando se cultiva bajo cualquier condición, el las cepas de tipo salvaje y ras2 aparecieron como levadura elíptica células en todas las etapas de gemación. A la temperatura permisiva más baja, la cepa mutante ras1 era indistinguible de tipo salvaje. En contraste, cuando el mutante ras1 la cepa se incubó a 37 ° C, se detuvo como grande, Células sin unir. Visualización de F-actina usando la faloidina conjugada con rodamina demostró que aunque la actina se localizó en el mutante ras1 a 37 ° C, fue des polarizado, indicativo de una pérdida de la asimetría del citoesqueleto de actina observado en brotes de tipo salvaje células (Fig. 3). Reintroducción del gen RAS1 de tipo salvaje en el mutante ras1 complementado estos mutantes ras1 defectos de polarización morfológica y de actina. Por lo tanto, la proteína *C. neoformans* Ras1 controla adecuadamente polarización de actina de una manera dependiente de la temperatura.

Anteriormente, observamos que las células mutantes ras1 eran crecimiento detenido pero viable después de 24 h de incubación a 37 ° C. Este final fue confirmado en los experimentos actuales en los que el tipo salvaje y cepas mutantes ras1 incubadas durante 48 h a 37 ° C fueron manchado con el tinte vital azul de metileno. Una idéntica proporción (5%) de células mutantes de tipo salvaje y ras1 tinte incorporado, que indica la muerte celular.

Por análisis Northern, el gen *C. neoformans* RAS1 es expresado en niveles bajos en medio rico y su expresión se induce por multiplicación por falta de nitrógeno. A diferencia de, expresión del gen RAS2 bajo varias condiciones no pudo ser detectado por el análisis Northern. ADN correspondiente al gen *C. neoformans* RAS2 podría ser amplificado fácilmente por PCR a partir de bibliotecas de ADNc, lo que indica que este gen se expresa a un nivel muy bajo.

El gen RAS2 se sobreexpresó en el mutante ras1 antecedentes para diferenciar entre dos posibles modelos. En el primer modelo, Ras1 y Ras2 comparten funciones superpuestas y Ras2 no puede compensar para fenotipos mutantes ras1 debido a una transcripción insuficiente. En este modelo, la sobreexpresión de RAS2 gen debería suprimir los fenotipos mutantes ras1. En el segundo modelo, Ras2 posee funciones completamente distintas de Ras1 y sobreexpresión del gen RAS2 no suprimiría los fenotipos mutantes ras1. El RAS2 gen fue clonado bajo el control de la constitutivamente promotor GPD1 activo (Varma y Kwon-Chung, 1999) e integrado en el genoma de la cepa mutante ras1 (LCC70) por transformación biolística. Dos transformantes fueron seleccionados para más pruebas fenotípicas (MWC28, 29) en el que se aumentó la expresión de RAS2 en comparación con el tipo salvaje basado en el análisis de transferencia Northern (Fig. 4a). Como control, el gen RAS2 bajo control de el promotor GPD1 se introdujo de manera similar en el Fondo de tipo salvaje RAS1 para crear el RAS1RAS2 cepa (MWC27).

La sobreexpresión del gen RAS2 suprimió completamente el Defecto de apareamiento mutante ras1. Cuando se incubó conjuntamente con el Cepa MATa JEC20, las cepas ras1RAS2 (MWC28, 29) apareados, así como la cepa de tiposalvaje (Fig. 5). Después de 48 h, se observaron montos de apareamiento vigoroso en las reacciones de apareamiento, incluidas las de tiposalvaje o cepas ras1RAS2. Se visualizaron hifas raras y delgadas en reacciones de apareamiento ras1 después de 48 h de incubación (Fig. 5). Después de 7 días, todas las estructuras de acoplamiento, incluida la abrazadera fusionada. Se observaron conexiones, basidios y basidiosporas. En reacciones de apareamiento de tiposalvaje y ras1RAS2. No apareamiento persistente. Los montos estaban presentes en el correspondiente reacciones de apareamiento ras1 después de una semana.

La sobreexpresión de RAS2 suprimió parcialmente el ras1 defecto de crecimiento mutante a alta temperatura. El tiposalvaje, Las manchas de ras1 mutante y ras1RAS2 se incubaron en Medio YPD a 25 y 37 ° C. En contraste con el ras1 cepa mutante en la que no se observó crecimiento a 37 ° C, las dos cepas ras1RAS2 pudieron crecer a la temperatura más alta, aunque no al ritmo de tiposalvaje (Fig. 4b).

Cuando se examinó microscópicamente, cepas en las que el gen RAS2 se sobreexpresó en el mutante ras1 antecedente también dio lugar a la supresión parcial de los defectos morfológicos mutantes ras1. En contraste con el cepa mutante ras1, menos células agrandadas y sin unir fueron observado entre las células ras1RAS2 incubadas en 37 ° C. De hecho, la gemación fue restaurada entre la mayoría de las células mutantes ras1 sobreexpresan el gen RAS2, lo que indica que la proteína Ras2 es capaz de suprimir parcialmente los defectos de morfogénesis y polarización de actina del ras1 mutante. No hubo cambios morfológicos significativos observado en la cepa de tiposalvaje en la que el gen RAS2 se sobreexpresó.

Las proteínas Ras pertenecen a una familia altamente conservada de proteínas de unión a nucleótidos de guanina unidas a membrana que regulan las vías de transducción de señales en diversos organismos. La capacidad de unir e hidrolizar GTP permite que las proteínas Ras existan en un GTP bound activo forma o una forma inactiva vinculada al PIB. El ciclo controlado entre estos dos estados es la base por la cual Ras sirve como un molecular cambiante vías de señalización. Por ejemplo, el p21 producto de genes ras de mamíferos ha sido claramente demostrado para controlar el crecimiento celular. Transformando las mutaciones de estos genes dan como resultado células no reguladas crecimiento y tumorigénesis.

Las proteínas Ras de mamíferos a microorganismos son. Es probable que comparta roles conservados en la regulación del crecimiento celular en respuesta a señales extracelulares. De hecho, divergente. Las proteínas Ras de eucariotas simples como los hongos pueden sustituir a algunos niveles de Ras de mamífero mutado proteínas. Sin embargo, las importantes funciones biológicas de los hongos. Los ras a menudo son distintos de los homólogos de mamíferos. El sch. pombe ras1 gen se requiere principalmente para diferenciación sexual. A diferencia de, dos genes RAS están presentes en el genoma de la gemación levadura *Sac. cerevisiae* y el patógeno fúngico *C. neoformans*. Mutación de ambos genes RAS en *Sac. cerevisiae* resulta en la detención del crecimiento, lo que sugiere que un cierto nivel de función Ras para la viabilidad (Kataoka et al., 1984; Tatchell et al., 1984). Aunque estos dos RAS los genes son bastante homólogos entre sí, los codificados. Las proteínas cumplen funciones superpuestas pero distintas. Por ejemplo, el *Sac. cerevisiae* Ras2 proteína juega un mayor papel que Ras1 en la regulación de la diferenciación y cAMP producción (Toda et al., 1985). Tales diferencias son probablemente sea el resultado de las diferencias en el nivel de transcripción de estos genes, así como la proteína real divergencia funcional. En la mayoría de las condiciones, *Sac. cerevisiae* RAS1 se expresa a aproximadamente una décima parte del nivel de RAS2. Cuando se colocó el gen RAS1 bajo control del promotor RAS2, sobreexpresión de Ras1 restableció el crecimiento invasivo haploide de ras2 *Sac. cepas* mutantes de *cerevisiae*.

Nuestros estudios en *C. neoformans* subrayan similitudes entre las vías Ras a través de especies fúngicas divergentes. Sin embargo, estos experimentos también demuestran las formas en las que los microorganismos patógenos han optado vías de transducción de señales conservadas para adaptarse a la entorno del host infectado. Aunque ninguno de los dos genes RAS de *C. neoformans* son esenciales, el defecto de crecimiento observado por *C. neoformans* ras1 ras2 cepas mutantes es similar a la detención del crecimiento de *Sac. cerevisiae* ras1 ras2 cepas mutantes dobles. Juntos, Estos resultados sugieren un papel conservado de las proteínas Ras en regulando el crecimiento vegetativo en hongos tan diversos como basidiomicetos y ascomicetos. Inhibición de ras la función de la proteína puede ofrecer nuevos objetivos para antifúngica terapia. Por ejemplo, se requiere farnesilación para función adecuada de las proteínas Ras. Por lo tanto, las drogas que bloquear la actividad de la farnesiltransferasa puede ser letal para los hongos.

6. Conclusión

También observamos una variación significativa en la transcripción de actividad entre los dos *C. neoformans* RAS genes. El gen RAS2 codifica una proteína funcional, y el ARNm RAS2 poliadenilado empalmado es detectable por transcriptasa inversa-PCR. Sin embargo, el nivel de este gen es insuficiente para ser visualizado por Análisis del norte después de la incubación en varias condiciones. Además, la mutación de los resultados del gen RAS2 en ningún fenotipo mutante discernible *in vitro* o *in vivo* en un modelo animal de criptococosis. Ya que incluso un defecto en el crecimiento y la diferenciación a menudo resultan en efectos discernibles sobre la virulencia, este resultado fuertemente argumenta que *C. neoformans* Ras2 no juega un papel importante en el crecimiento, transiciones morfológicas o inducible factor de virulencia de expresión. Cuando se sobreexpresa, RAS2 es capaz de restaurar el apareamiento y el crecimiento a altas temperaturas de una cepa mutante *ras1*. Estos datos son similares a *Sac. cerevisiae* que tiene dos genes RAS que poseen funciones superpuestas. En cada organismo, uno de estos genes está más altamente transcrito y codifica el elemento predominante de señalización Ras. Desde la sobreexpresión de elementos reguladores puede dar lugar a no fisiológicos efectos, todavía no podemos establecer si las funciones de Ras2 sugeridas en la sobreexpresión los estudios representan verdaderas actividades compartidas de estos dos moléculas de señalización similares. Sin embargo, el hecho de que todos los fenotipos mutantes *ras1* se suprimen en el nivel por sobreexpresión de RAS2 sugiere que Ras2 es un funcional Proteína Ras.

Los dos genes RAS de *C. neoformans* pueden haber surgido de duplicación de genes individuales o por genoma completo duplicación. El sacocompletado. genoma *cerevisiae* el proyecto ha permitido un análisis detallado del orden genético y organización cromosómica. Se estima que al menos el 15% del genoma de esta levadura está compuesto por bloques de genes duplicados, y los patrones de duplicación son consistentes con un antiguo evento de duplicación del genoma seguido por la pérdida de genes. El proyecto del genoma de *C. neoformans* Ayuda a determinarse si RAS1 y RAS2 se encuentran en bloques similares de synteny o si la duplicación individual de un RAS gen precursor es más probable. Otros ejemplos de la posible duplicación de genes en *C. neoformans* incluye los genes homólogos de ciclofilina A CPA1 y CPA2.

Aunque hay muchas características compartidas en la señalización Ras en hongos tan diversos como la levadura incipiente y *C. neoformans*, también hay diferencias significativas. La proteína *C. neoformans* Ras1 juega un papel importante en permitiendo el crecimiento a altas temperaturas y por lo tanto requerido para el potencial de virulencia de este organismo. A pesar de que el gen RAS2 puede suprimir parcialmente el *ras1* defecto de crecimiento mutante a alta temperatura cuando se sobreexpresa, no observamos evidencia de una compensación a un aumento en la transcripción RAS2 después de la mutación de la Gen RAS1. Por lo tanto, aunque estas proteínas Ras comparte una función potencialmente redundante, Ras2 no parece actuar normalmente en lugar de un Ras1 disfuncional. Ras2 puede haber evolucionado para proporcionarnos simplemente un nivel basal de la función Ras permite un crecimiento vegetativo eficiente, pero no es una función Ras inducible suficiente para la diferenciación o crecimiento a alta temperatura.

Nuestros resultados no respaldan un modelo en el que los dos *C. neoformans* Ras proteínas de Neoformans actúan en diferentes pasos de la misma ruta de señalización lineal ya que hay un aditivo efecto sobre el crecimiento con mutación tanto de RAS1 como de RAS2. Por lo tanto, los roles fisiológicos de estas proteínas son es probable que estén en vías de señalización paralelas o como efectores redundantes del mismo evento de señalización en un Sendero único.

Los cambios morfológicos de la cepa mutante *ras1* son muy similar a los observados en *Sac. cerevisiae* cepas de *cerevisiae* con mutaciones sensibles a la temperatura de CDC42 gen (Adams et al., 1990). CDC42 codifica un q-like GTPasa en levadura que controla la actividad de las quinasas PAK, desempeñando un papel central en determinando la polaridad celular y la morfogénesis. Esta proteína parece funcionar corriente abajo de *Sac. cerevisiae* Ras2 para regular el crecimiento legislativo. Recientemente, la proteína Ras2 de *Sac. cerevisiae* era también demostró ser un regulador primario de actinopolaridad del citoesqueleto. Similar a nuestros resultados en *C. neoformans*, mutación del gen RAS2 en levadura resultó en una cepa que no pudo crecer a temperaturas elevadas y que muestran temperatura dependiente de polarización del citoesqueleto de actina. Juntos, nuestras observaciones y la evidencia final en *Sac. cerevisiae* apoyan un modelo de conservación de función Ras en hongos para regular la polaridad celular y la actin localización.

En conclusión, las similitudes en Ras funcionan entre microorganismos divergentes demuestran que estas señales las moléculas juegan un papel central en el crecimiento de hongos y desarrollo. Sin embargo, estas vías también tienen diferencias en especies patógenas para permitir microbios adaptación e infección de

huéspedes mamíferos. Elucidación de las señales de activación de Ras y aguas abajo las moléculas efectoras proporcionarán más información sobre el mecanismo molecular de patogenicidad microbiana.

Referencias

- [1] Cordeiro, R.A., Evangelista, A.J.J., Serpa, R., de Farias Marques, F.J., de Melo, C.V.S., de Oliveira, J.S., da Silva Franco, J., de Alencar, L.P., de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira, T., Brilhante, R.S.N., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. (2016) "Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex", *Microbiology (United Kingdom)*, 162 (2), pp. 309-317.
- [2] Kang, Y., Choi, H.T. (2016) "Inhibition of cell wall synthesis in *Cryptococcus neoformans* and decrease of skin allergy induced with *Alternaria alternata* in mouse model by a chitinase from an inky cap", *Korean Journal of Microbiology*, 52 (2), pp. 226-229.
- [3] Bosco-Borgeat, M.E., Mazza, M., Taverna, C.G., Córdoba, S., Murisengo, O.A., Vivot, W., Davel, G. (2016) "Amino acid substitution in *Cryptococcus neoformans* lanosterol 14- α -demethylase involved in fluconazole resistance in clinical isolates", *Revista Argentina de Microbiología*, 48 (2), pp. 137-142.
- [4] Jung, K.-W., Lee, K.-T., So, Y.-S., Bahn, Y.-S. (2018) "Genetic Manipulation of *Cryptococcus neoformans*", *Current Protocols in Microbiology*, 50 (1), pp. e59.
- [5] Yadav, V., Sanyal, K. (2018) "Sad1 spatiotemporally regulates kinetochore clustering to ensure high-fidelity chromosome segregation in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*", *mSphere*, 3(4), pp. e00190-18.
- [6] Rodrigues, J., Ramos, C.L., Frases, S., Godinho, R.M.D.C., Fonseca, F.L., Rodrigues, M.L. (2018) "Lack of chitin synthase genes impacts capsular architecture and cellular physiology in *Cryptococcus neoformans*", *Cell Surface*, 2, pp. 14-23.
- [7] Dambuza, I.M., Drake, T., Chapuis, A., Zhou, X., Correia, J., Taylor-Smith, L., LeGrave, N., Rasmussen, T., Fisher, M.C., Bicanic, T., Harrison, T.S., Jaspars, M., May, R.C., Brown, G.D., Yuecel, R., MacCallum, D.M., Ballou, E.R. (2018) "The *Cryptococcus neoformans* Titan cell is an inducible and regulated morphotype underlying pathogenesis", *PLoS Pathogens*, 14(5), pp. e1006978.
- [8] Dienstmann, G., Avi, K.T., Leite, L.A.C., Alano, J.S., Souza, M.L.R.D., Mulazani, M.D.S., Mendivil, P.C.G. (2019) "First case report of fulminant septic shock from meningococemia associated with *Cryptococcus neoformans* coinfection in an immunocompetent patient", *Medical Mycology Case Reports*, 26, pp. 44-46.
- [9] Niedźwiecka, K., Ribas, D., Casal, M., Ułaszewski, S. (2019) "The *Cryptococcus neoformans* monocarboxylate transporter Jen4 is responsible for increased 3-bromopyruvate sensitivity", *FEMS Yeast Research*, 19 (3).
- [10] Orivaldo, B., Campello, S. (2018) "A case study on dengue fever and pregnancy", *Boletín De Malariología Y Salud Ambiental*, 58(4), pp. 49-54.
- [11] Zhang, C., García-Rodas, R., Molero, C., de Oliveira, H.C., Taberero, L., Reverter, D., Zaragoza, O., Ariño, J. (2019) "Characterization of the atypical Ppz/Hal3 phosphatase system from the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*", *Molecular Microbiology*, 111 (4), pp. 898-917.
- [12] Probert, M., Zhou, X., Goodall, M., Johnston, S.A., Bielska, E., Ballou, E.R., May, R.C. (2019) "A glucuronoxylomannan epitope exhibits serotype-specific accessibility and redistributes towards the capsule surface during titanization of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*", *Infection and Immunity*, 87 (4), pp. e00731.
- [13] Surawut, S., Makjaroen, J., Thim-uam, A., Wongphoom, J., Palaga, T., Pisitkun, P., Chindamporn, A., Leelahavanichkul, A. (2019) "Increased susceptibility against *Cryptococcus neoformans* of lupus mouse models (pristane-induction and FcGRIIb deficiency) is associated with activated macrophage, regardless of genetic background", *Journal of Microbiology*, 57 (1), pp. 45-53.
- [14] Movahed, E., Cheok, Y.Y., Tan, G.M.Y., Lee, C.Y.Q., Cheong, H.C., Velayuthan, R.D., Tay, S.T., Chong, P.P., Wong, W.F., Looi, C.Y. (2018) "Lung-infiltrating T helper 17 cells as the major source of interleukin-17A production during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection", *BMC Immunology*, 19 (1), pp. 32.
- [15] García-Barbazán, I., Trevijano-Contador, N., Rueda, C., de Andrés, B., Pérez-Tavárez, R., Herrero-Fernández, I., Gaspar, M.L., Zaragoza, O. (2016) "The formation of titan cells in *Cryptococcus neoformans* depends on the mouse strain and correlates with induction of Th2-type responses", *Cellular Microbiology*, 18 (1), pp. 111-124.

Ras Regulation of Actin Polarization in Cryptococcus Neoformans

Abstract

The mechanisms by which cells sense and adapt to changes in the environment are mediated by conserved signal transduction pathways that couple specific extracellular signals to defined cellular outputs. Ras proteins are conserved regulators of signal transduction pathways that mediate adaptive changes, such as cellular development and morphogenesis.

Key words: Cryptococcus Neoformans, Morphogenesis, Actin Polarization