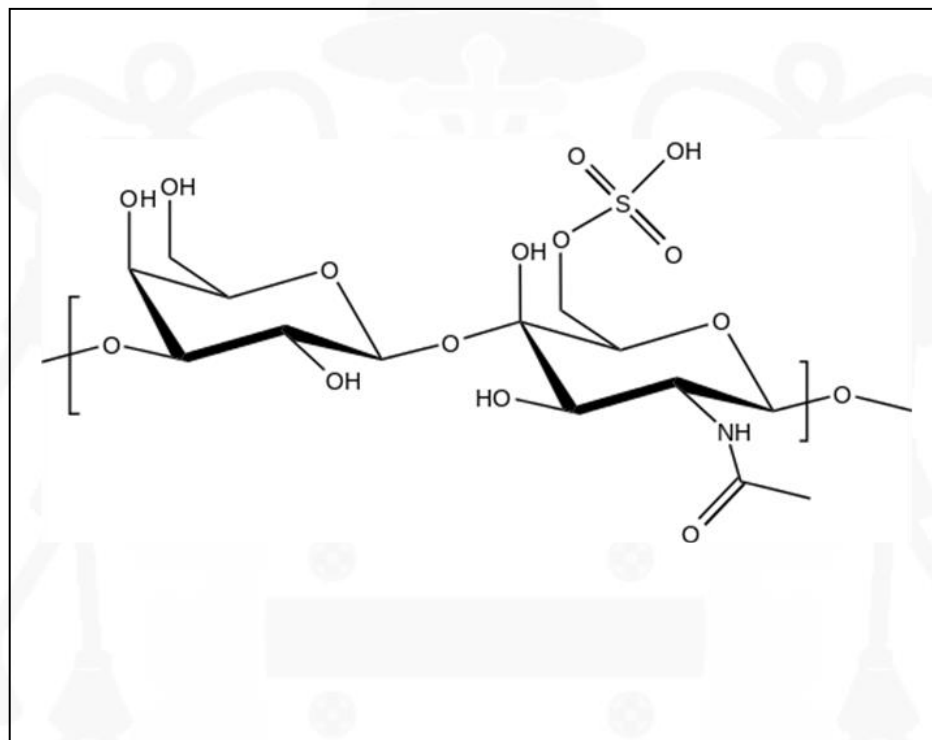


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOLOGÍA

Alteraciones en la expresión de genes responsables de la síntesis y modificación de queratán sulfato en piel inducida por la interacción de hongos patógenos



Magnus Alasdair Sinclair Pearse

Departamento de Biología Funcional/Microbiología

Junio/2023



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



Resumen

Los glicosaminoglicanos son polisacáridos que representan un elemento clave en la composición de la matriz extracelular. Suelen encontrarse unidos a núcleos proteicos formando proteoglicanos, y están implicadas en procesos como la adhesión y migración celular, la hidratación tisular, la comunicación célula-célula, y el desarrollo de patologías genéticas e infecciosas.

En este trabajo se estudiaron los cambios en los genes *CHST1*, *CHST6*, *B3GNT7* y *B4GALT4*, involucrados en la polimerización y modificación de las cadenas del queratán sulfato en dos líneas celulares de piel humana (queratinocitos como representantes de epidermis y fibroblastos como representantes de dermis) en presencia de los hongos *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*.

En los resultados se observó la expresión diferencial de los genes estudiados en ambas líneas celulares en contacto tanto con *C. albicans* como con *C. parapsilosis*. Mientras que ambos hongos producen las mismas alteraciones en la línea de fibroblastos, *C. albicans*, la línea de queratinocitos presenta un mayor número de genes alterados. El contacto con *C. albicans* produce un número total de cambios mayor que *C. parapsilosis*.

Glycosaminoglycans are an important component of the ECM. They are usually found linked to protein-cores forming proteoglycans and involved in processes such as cell-cell communication, cell adhesion and migration, tissue hydration and the development of both infectious and hereditary diseases.

In this study, the expression of four key genes involved in the polymerization and modification of keratan sulfate (*CHST1*, *CHST6*, *B3GNT7* and *B4GALT4*) are analyzed in two cell lines representative of human skin—keratinocytes (epidermis) and fibroblasts (dermis)—in contact with two species of yeast, *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*.

Both cell lines showed alterations in gene activity in the presence of each species of yeast. *C. albicans* induced more numerous and intense changes in gene expression than *C. parapsilosis*.

Índice

Abreviaturas.....	1
1. Introducción.....	2
2. Justificación.....	11
3. Objetivos.....	12
4. Material y métodos.....	12
4.1. Hongos.....	12
4.2. Células humanas.....	13
4.2.1. Fibroblastos.....	13
4.2.2. Queratinocitos.....	13
4.3. Ensayo de adherencia.....	13
4.4. Extracción de ARN.....	14
4.5. Reacción de Transcripción Inversa (RT-PCR).....	14
4.6. PCR a Tiempo Real (Q-PCR).....	14
4.7. Tratamiento de datos.....	16
5. Resultados.....	16
5.1. Análisis de la expresión diferencial de <i>B3GNT7</i> , <i>B4GALT4</i> , <i>CHST1</i> y <i>CHST6</i> en queratinocitos.....	16
5.2. Análisis de la expresión diferencial de <i>B3GNT7</i> , <i>B4GALT4</i> , <i>CHST1</i> y <i>CHST6</i> en fibroblastos.....	17
6. Discusión.....	19
7. Conclusiones.....	21
Referencias.....	22

Abreviaturas

AH: Ácido hialurónico

CHST: Carbohydrate sulfotransferase

CS: Condroitín sulfato

DS: Dermatán sulfato

GAG: Glicosaminoglicano

Gal: Galactosa

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HS: Heparán sulfato

KS: Queratán sulfato

MEC: Matriz extracelular

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PG: Proteoglicano

Q-PCR: PCR a tiempo real

RT-PCR: PCR de transcripción inversa

1. Introducción

Antecedentes

La piel es un órgano que actúa como barrera que tapiza las superficies del cuerpo, actuando como una de las primeras líneas de defensa que posee el organismo frente a patógenos externos. Está compuesta anatómicamente por dos capas: la epidermis, formada por queratinocitos, y la dermis, compuesta por fibroblastos y una matriz rica en fibras (Egert & Simmering, 2016). Las células epiteliales de la epidermis tienen tres características fundamentales: están fuertemente unidas mediante uniones gap, presentan polaridad funcional y morfológica, y su superficie basal está unida a una membrana basal (Ross & Pawlina, 2016).

Existen varias clases de epitelio distribuidas por el organismo, cada una con sus propias funciones especializadas. El epitelio externo, la epidermis, representa la primera barrera de defensa con la que se encuentran la mayor parte de los posibles patógenos. Esta capacidad es concedida en parte por la estrecha unión célula-célula del epitelio, su gran capacidad de renovación, la secreción de sustancias antimicrobianas, y también su microbiota. Además de actuar como barrera fisicoquímica, el epitelio actúa a modo de interfaz entre el organismo y la microbiota que lo coloniza. Tanto la microbiota como las propias células epiteliales juegan un papel importante en la señalización con el sistema inmune en caso de infección.

La composición de la microbiota normal de la piel comprende bacterias, arqueas, hongos y virus. La distribución de los integrantes de la flora microbiológica suma un total de 10^{10} individuos, distribuidos heterogéneamente sobre la superficie (Abdallah *et al.*, 2017; Egert & Simmering, 2016). La topografía de la piel favorece la colonización de microbiota específica en diferentes regiones del organismo. Mientras que las bacterias se distribuyen según las características fisiológicas del organismo colonizando diferencialmente zonas de piel húmeda, seca y grasa (Nguyen & Kalan, 2022), los hongos se distribuyen según las regiones anatómicas del cuerpo.

La ocupación de nichos ecológicos, la síntesis de péptidos microbicidas, y la secreción de metabolitos ácidos ayuda a evitar la colonización de los epitelios por parte de posibles patógenos (Egert & Simmering, 2016). Además, la interacción entre la microbiota sana

y el organismo favorece el correcto desarrollo del sistema inmune (Abdallah *et al.*, 2017). Sin embargo, la eventual alteración de la función normal de la piel, como en el caso de una herida, puede alterar a su vez la composición de la microbiota, viéndose modificada la simbiosis microbiota-organismo. Muchos de los microorganismos habituales de la piel pueden aprovechar esta disfunción pasando a comportarse como patógenos oportunistas.

Hongos

Uno de los grupos de microorganismos que se pueden encontrar en la piel son los hongos. Pertenecientes al subreino Heterokontobionta y Mycobionta, los organismos conocidos como hongos, antes comprendidos todos en el antiguo reino Fungi, son un diverso grupo de microorganismos eucariotas y heterótrofos con formas de vida tanto saprófitas como parásitas y simbiotes. Son conocidos comúnmente como hongos y setas, y sus células se caracterizan por tener paredes compuestas por quitina y glucanos (Gow *et al.*, 2017). Los hongos suelen ser aerobios, aunque existen especies anaerobias y anaerobias facultativas.

Las células de los hongos pluricelulares adquieren una morfología de filamentos, característica que se denomina “hifa”. Las hifas se agrupan formando el talo del hongo, con una cierta especialización entre ellas. Las especies unicelulares se caracterizan por poseer una morfología redondeada, o de levadura.

Los hongos no suelen ser patógenos en los seres humanos, salvo en individuos inmunocomprometidos. Pocos hongos son patógenos estrictos, sin embargo, se podría decir que todo hongo puede potencialmente comportarse como patógeno oportunista.

Muchos hongos son dimórficos, con la capacidad de alternar una forma por otra a lo largo de su vida. En el grupo ascomycota existen especies de hongos un dimorfismo térmico. El dimorfismo térmico es una característica clave para la patogenicidad. Esto les permite adquirir su forma de levadura de forma reversible y adaptarse a la temperatura interna del huésped. Algunos de los factores implicados en la regulación de la displasia térmica son el pH, la tensión de CO₂, cisteína exógena y estradiol (Gauthier, 2015, 2017).

Pese a que los hongos no suelen ser patógenos, en situaciones de disbiosis o inmunosupresión, pueden producir enfermedades conocidas como micosis. Estas patologías suelen ser superficiales y poco importantes. Las más comunes son las tiñas, causadas por los hongos dermatofitos, llegando a afectar en algún momento de la vida a un 25% de la población (Brown *et al.*, 2012). Otras patologías comunes son las causadas en las mucosas orales y genitales por hongos del género *Candida*, afectando hasta un 75% de la población (Brown *et al.*, 2012).

Las micosis se pueden categorizar en tres clases (Madigan *et al.*, 2019):

- Micosis superficiales: afectan solamente la superficie del epitelio, las uñas y el pelo.
- Micosis subcutáneas: afectan capas más profundas de la piel.
- Micosis sistémicas: afectan los órganos internos del organismo y pueden suponer un riesgo grave para la vida. Si afectan a una persona sana se consideran primarias, y si afectan a una persona inmunocomprometida, secundarias.

Hongos del género *Candida*: *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*

El género *Candida*, de la división Ascomycetes, representa uno de los mayores grupos de hongos patógenos oportunistas de los seres humanos. Mientras que *Candida* forma parte de la microbiota normal de los epitelios del ser humano, concretamente de las mucosas, aunque bajo determinadas circunstancias puede producir enfermedades denominadas candidiasis. Las candidiasis son una de las enfermedades nosocomiales más comunes, además de ser frecuentes en personas inmunocomprometidas (Papon *et al.*, 2013).

Las candidiasis pueden ser clasificadas en tres grupos principales según la región del cuerpo que afectan. Se consideran candidiasis superficiales las que afectan a la cavidad bucal, la piel, los genitales, el sistema respiratorio y el tracto gastrointestinal (Mba & Nweze, 2020). Las candidiasis cutáneas afectan a las capas más profundas del epitelio, y las candidiasis sistémicas se caracterizan por la diseminación del hongo a otros órganos a través de la sangre.

Casi un 70% de mujeres padecen en algún momento de su vida un episodio de Candidiasis vulvovaginal (Bongomin *et al.*, 2017). *Candida albicans* es la especie culpable de la gran mayoría de las candidiasis de las mucosas. Las candidiasis sistémicas ocurren principalmente tras intervenciones quirúrgicas y tienen una mortalidad del 42% (Mba & Nweze, 2020).

Mientras que *C. albicans* suele ser la causante de las candidiasis y candidemias, en las últimas décadas se ha visto un incremento en la infección por otras especies de *Candida*, como *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis* (Bongomin *et al.*, 2017).

El cambio de miembro inocuo de la microbiota a patógeno invasor está mediado por la expresión de genes relacionados con el crecimiento de las hifas, la adherencia a las células epiteliales, la evasión del sistema inmune, el dimorfismo fúngico, la formación de biofilms y la secreción de enzimas exocelulares. Los mecanismos genéticos implicados en estas características están altamente relacionados entre sí (Mba & Nweze, 2020).

La invasión de *Candida sp.* comienza con la adhesión del hongo en forma de levadura al epitelio. Esto ocurre gracias a la expresión de adhesinas como Hwp1p (*Hyphal Wall Protein 1*)(Richardson *et al.*, 2018) y invasinas tipo de tipo ALS (*Aglutinin Like Sequences*) como Als3p en *C. albicans*, que interaccionan con el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR/HER2 induciendo endocitosis por parte de las células epidérmicas (Mba & Nweze, 2020). Una vez en contacto con el epitelio, algunas especies de *Candida* como *C. albicans* y *C. tropicalis* sufren un cambio morfológico y adquieren una organización hifal. Otras especies, como *C. parapsilosis* no poseen forma hifal y realizan la colonización del epitelio en forma de levadura. La morfología hifal parece aportar ventajas relacionadas con la obtención de nutrientes y la adhesión del hongo a los epitelios. Las mucosas vaginales y orales dificultan la invasión por endocitosis y *Candida* emplea la extensión de las hifas combinada con enzimas hidrolíticas como SAP para penetrar activamente el epitelio (Mba & Nweze, 2020). El hongo, en forma de levadura, puede diseminarse a través de los vasos sanguíneos y colonizar el endotelio de otros órganos, produciendo una candidiasis sistémica o candidemia.

Otro factor de virulencia destacable es la formación de biofilms por parte de múltiples especies del género *Candida*. Los biofilms son grupos organizados de células sujetas a un soporte sólido y embebidas en una matriz polisacáridica. Las condiciones fisicoquímicas del interior del biofilm son radicalmente diferentes a las externas: la matriz dificulta la difusión de sustancias, produciendo un gradiente de oxígeno y otros metabolitos, además de cualquier tipo de fármaco administrado. Esto además produce una alteración en las rutas metabólicas de las células en el biofilm, activándose mecanismos de resistencia al estrés oxidativo. La formación de biofilms en *Candida* está regulada por Als3 (también importante en la adhesión y colonización del epitelio). Además, los mismos factores de transcripción que regulan la filamentación de las hifas controlan también la expresión de adhesinas durante la formación de los biofilms (Mba & Nweze, 2020). Por último, *Candida spp.* puede interactuar con la microbiota de los epitelios y endotelios que está colonizando. La coagregación de *C. albicans* y *Streptococcus mutants* produce biofilms con una masa muy superior a biofilms con un solo organismo. Durante la invasión en mucosas por *C. albicans*, los biofilms formados por *Staphylococcus aureus* producen infecciones de muy elevada virulencia comparadas con aquellas producidas en ausencia de *C. albicans* (Mba & Nweze, 2020).

Candida spp. posee además una gran flexibilidad metabólica que le permite competir con la microbiota normal del epitelio, gracias a las β -hemolisinas que permite la obtención de hierro, y una variedad de enzimas exocelulares como fosfolipasas y proteinasas, además de proteínas citotóxicas específicas como la candidalisina (Mba & Nweze, 2020). Esto, unido a su capacidad para adaptarse a fluctuaciones en el pH le permite sobrevivir la fagocitosis por parte de monocitos.

Proteoglicanos

Los proteoglicanos (PGs) son macromoléculas complejas tanto estructural como químicamente. Están formados por un núcleo proteico, al que se encuentran anclados covalentemente glicosaminoglicanos (GAGs) (Couchman & Pataki, 2012). Como uno de los componentes claves de la matriz (MEC), son casi omnipresentes en los organismos multicelulares. Tienen un abanico vasto de funciones que abarca desde la hidratación de la MEC hasta señalización celular durante el desarrollo y los procesos de regeneración (Couchman & Pataki, 2012; Iozzo & Schaefer, 2015).

Según su localización se distinguen cuatro clases de PGs: PGs intracelulares, PGs de la superficie celular, PGs pericelulares y PGs extracelulares, aunque existen otras clasificaciones en base a la naturaleza de los núcleos proteicos y los tipos de GAGs que componen el PG (Iozzo & Schaefer, 2015).

En cuanto a sus funciones, los PGs participan en la arquitectura tisular durante el desarrollo, aportan propiedades físicas a los tejidos, como la resistencia a la compresión, regulan la presión osmótica, y participan en procesos de señalización célula-célula y adhesión (Iozzo & Schaefer, 2015).

Glicosaminoglicanos

Los GAGs son polisacáridos lineales comúnmente encontrados formando parte de los PGs.

Estructuralmente los GAGs están formados por disacáridos repetidos. Frecuentemente uno de los azúcares es N-acetilglucosamina (GlcNAc) o N-acetilgalactosamina, y el otro un ácido urónico (Prydz, 2015). Exceptuando al ácido hialurónico, las cadenas suelen estar sulfatadas o carboxiladas en uno o ambos de los azúcares, por lo que son polímeros con una carga muy negativa (Alberts *et al.*, 2015).

Según la composición de los disacáridos, se distinguen cuatro GAGs principales (Ricard-Blum & Perez, 2022) (**Fig. 1**): heparán sulfato (HS)/heparina (H), condroitín sulfato (CS)/dermatán sulfato (DS) ácido hialurónico (AH), y queratán sulfato (KS).

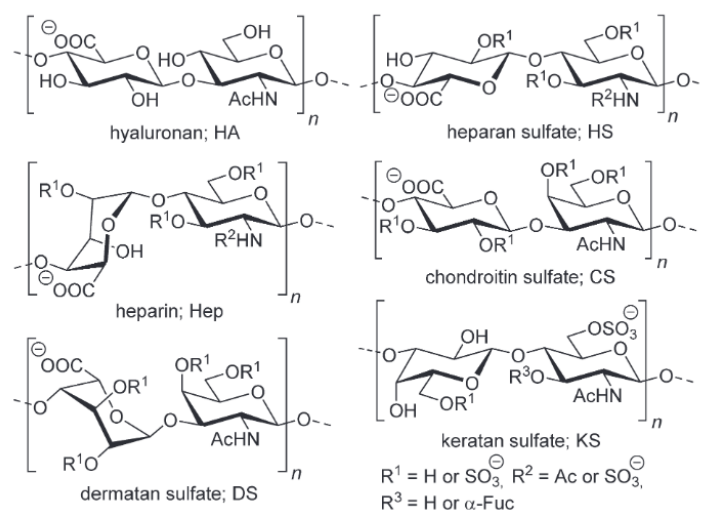


Figura 1: Fórmula esquelética de los disacáridos constituyentes de los diferentes tipos de glicosaminoglicanos. (Ohmae *et al.*, 2019)

El carácter aniónico de las GAGs produce la atracción de cationes como Na^+ y Ca^{2+} resultando en la retención de agua por ósmosis, confiriéndole a la MEC sus propiedades viscoelásticas y otorgando resistencia a la compresión a los tejidos.

Además de sus propiedades hidratantes, las GAGs interactúan con otras proteínas interviniendo en procesos de señalización celular, regulando procesos de migración, y adhesión y mediando la invasión de patógenos (Jones *et al.*, 2010).

Queratán sulfato

El KS está formado por dímeros de GlcNAc y Galactosa (Gal) unidos por enlaces $\beta(1-3)$ y $\beta(1-4)$ -O-glucosídicos (Ohmae *et al.*, 2019). La cadena puede llevar varias modificaciones, la más común siendo la sulfatación en el C-6 de GlcNAc, aunque también existen regiones no sulfatadas (Caterson & Melrose, 2018), sulfataciones en Gal, o unidades disulfatadas (Ohmae *et al.*, 2019). Los dímeros también pueden ser fucosilados en el carbono tres de GlcNAc y las cadenas suelen tener un monosacárido terminal distinto, generalmente N-acetilneuramínico (ácido siálico) (Ohmae *et al.*, 2019). Por último, puede variar la forma de anclaje de la cadena polisacáridica a los núcleos proteicos de los PGs dependiendo del tejido y de la clase de KS.

El KS se localiza principalmente en tres zonas diferentes del cuerpo: la córnea, el cerebro y las articulaciones. El KS de estos tres tejidos posee modificaciones características que permiten clasificar tres variantes de la molécula (**Fig. 2**):

- KS corneal (KSI): se encuentra principalmente en la córnea y se anclan las cadenas de KS a los carbonos 6 y 2 de un oligosacárido de unión, formando estructuras biantenarias. Este complejo queda unido al núcleo proteico de las glicoproteínas a través de un residuo de Asn (Funderburgh, 2002). El KSI es destacable por su función en la hidratación de la córnea y el mantenimiento de sus propiedades ópticas (Funderburgh, 2000), formando parte de los PGs lumicano, mimecano y queratocano. Estos PGs participan en la organización y mantenimiento de las fibrillas de colágeno que componen el estroma corneal (Quantock *et al.*, 2010). El KSI también se encuentra en menor medida en el cartílago y modificando proteínas como la fibromodulina, osteoadherina (Funderburgh, 2002), queratocano y lumicano (Caterson & Melrose, 2018).

- KS esquelético (KSII): se encuentra principalmente formando parte de la MEC de los tejidos cartilagosos. Las cadenas de KSII son más cortas que KSI, con regiones disulfatadas o monosulfatadas en GlcNAc, y la galactosa en la región de unión a la proteína suele estar sializada. La GAG se une al núcleo proteico del PG a través de residuos de Ser y Thr (Funderburgh, 2000).

El principal PG que forma KSII es el agregcano. El agregcano es un PG de gran tamaño sustituido por KS y CS y su principal función es el de la hidratación de los tejidos cartilagosos. En cooperación con AH, el agregcano forma macroagregados que confieren a los tejidos cartilagosos la resistencia a la compresión (Caterson & Melrose, 2018).

- KS cerebral (KSIII): se encuentra principalmente en el cerebro, unido al núcleo proteico de glicoproteínas a través de una α -manosa (Ohmae *et al.*, 2019). Forma parte de PGs como el fosfacano y participa en la regulación de procesos de desarrollo y reparación neuronal (Caterson & Melrose, 2018).

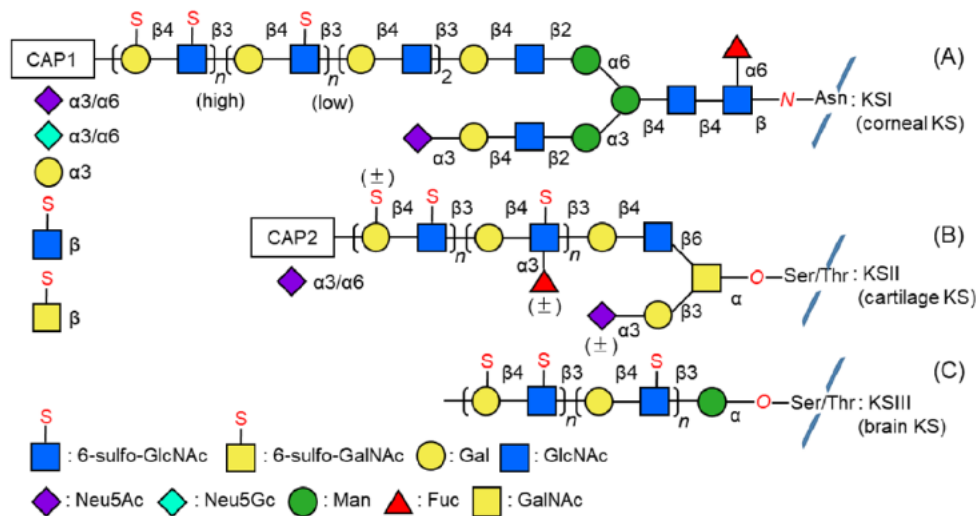


Figura 2: Las tres clases de KS y sus diferencias estructurales (Ohmae *et al.*, 2019)

Biosíntesis de KS

La síntesis de la cadena principal de KS es realizada por la acción alternante de una B-1,4-galactosyltransferasa (B4GALT4) y una B-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa (B3GNT7) (Fig. 3) (Funderburgh, 2000).

La sulfatación de la cadena es realizada por una N-acetilglucosaminil-6-sulfotransferasa (CHST6) y una galactosa-6-sulfotransferasa (CHST1). La primera actúa sobre los residuos

de GlcNAc terminales, mientras que la segunda actúa principalmente sobre los residuos de Gal internos (**Fig. 3**) (Funderburgh, 2000).

Existen varias isoformas de estas enzimas con actividad tejido-específica. En la córnea, la N-acetilglucosaminil-6-sulfotransferasa principal es CHST6, existiendo otras dos isoformas que predominan en el cartílago y cerebro (Ohmae *et al.*, 2019). La sulfatación de Gal en la córnea es realizada por CHST1, pero en otros tejidos como el cartílago, su actividad es sustituida por condroitín sulfotransferasa-1 (C6ST) (Funderburgh, 2002).

La acción de diferentes enzimas sobre la estructura básica de KS, además de variaciones en sus azúcares terminales y otras modificaciones menos frecuentes como la fucosilación, incrementan aún más la posible diversidad estructural de KS.

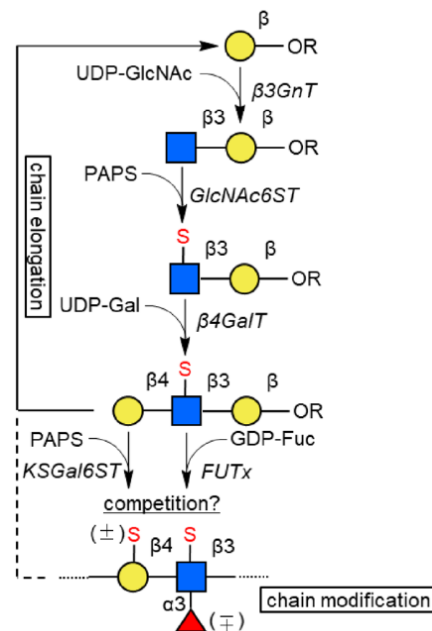


Figura 3: Elongación y modificación del KS (Ohmae *et al.*, 2019)

Funciones del KS y sus PGs

El KS, en conjunto con los PGs de los que forma parte, desempeña funciones de importancia estructural, osmótica y bioquímica. La función por excelencia del KS en la córnea y el cartílago es la de hidratación tisular. KSPGs corneales como lumicano y mimecano juegan papeles de vital importancia en la orientación de las fibrillas de colágeno del estroma corneal. Alteraciones en los patrones de sulfatación de KSI desenlaza en el desarrollo de patologías oculares como queratoconos (Caterson & Melrose, 2018) y la distrofia macular corneal (MCD) (Funderburgh, 2002). Esta última

está asociada a mutaciones en el gen *CHST6* (Caterson & Melrose, 2018; Pomin, 2015). Los fallos en la sulfatación de KSI producen una alteración en la arquitectura de las fibrillas de colágeno del estroma corneal, ocasionando la opacidad corneal.

KSPGs como mimecano, osteoadherina y keratocano participan en los procesos de osificación, mientras que otros como SV2, ABAKAN y PG1000 participan en procesos de neurotransmisión (Caterson & Melrose, 2018). Fallos en la sulfatación de KS están ligados también a la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Hirano *et al.*, 2013), Alzheimer y epilepsia (Caterson & Melrose, 2018).

Algunas KSPGs como el lumicano han sido estudiadas por sus propiedades angiostáticas en células endoteliales. Esto, junto al carácter antiadherente del KS (Caterson & Melrose, 2018), contribuye a cierta funcionalidad anticáncer. Sin embargo, la expresión ectópica de KS aumenta la invasividad de melanomas (Tachibana *et al.*, 2022).

No se ha descrito el papel de KS en procesos de invasión y adhesión de patógenos como en el caso de otras GAGs como CS y HS (Ordiales *et al.*, 2022).

2. Justificación

Alteraciones tanto en la cadena de polilactosamina como en los patrones de modificación de KS interrumpen la función normal de las KSPG y producen enfermedades que abarcan desde trastornos neurológicos como Alzheimer y ELA hasta disfunciones oculares como la CMD.

Por otro lado, el papel de KS en los procesos de adhesión e invasión de patógenos no ha sido estudiada. Mientras que se ha comprobado la importancia de GAGs como CS y HS en la adhesión de *Candida spp.* a células corneales (Ordiales *et al.*, 2022), se desconoce la trascendencia de KS, el GAG por excelencia de la córnea, en estos procesos.

Entender cómo se ve alterada la expresión de genes relacionados en la síntesis de KS en queratinocitos y fibroblastos humanos en presencia de dos especies de hongos patógenos, *C. albicans* y *C. parapsilosis*, podría permitir entender mejor los mecanismos de patogénesis de enfermedades como la queratitis ocular micótica y en un futuro enfocar el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos.

3. Objetivos

El objetivo del trabajo ha sido estudiar si las especies fúngicas *C. albicans* y *C. parapsilosis* interfieren en la síntesis normal de KS en queratinocitos y fibroblastos de piel humana. Para ello se observó la expresión de cuatro genes claves para la síntesis de KS: *B3GNT7*, *B4GALT4*, *CHST1* y *CHST6*.

Para llevarlo a cabo, se realizaron los siguientes pasos:

1. Cultivo de los hongos *C. albicans* y *C. parapsilosis*.
2. Cultivo de queratinocitos y fibroblastos de piel humana.
3. Extracción y procesamiento del ARN expresado en cultivos celulares en presencia y ausencia de los hongos.
4. Obtención del ADNc a partir del ARN extraído mediante reacción de una transcriptasa inversa para valorar la expresión génica.
5. Análisis mediante PCR a tiempo real (Q-PCR) de la transcripción diferencial de los genes implicados en la síntesis del KS.
6. Análisis de los resultados.

4. Material y métodos

4.1. Hongos

Para realizar el estudio se emplearon dos especies de hongos del género *Candida* comúnmente patógenos oportunistas del ser humano: *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Los cultivos fueron proporcionados por el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Oviedo (HUCA).

4.1.1 Condiciones de cultivo

Para el cultivo de ambas especies de *Candida* se empleó un medio de cultivo agar Sabouraud (Becton-Dickison, BD). Se inocularon 10 ml del medio de cultivo al 1% con las dos especies de *Candida* de manera independiente y se incubaron los cultivos durante 16 horas a 37°C. Tras ello, 10 ml de cultivo fresco fueron reinoculados al 1%, incubados, y una vez alcanzada una densidad óptica de 0,5 a 550 nm fueron centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado mediante un lavado con tampón fosfato salino (PBS). Finalmente, el sedimento fúngico se resuspendió con 10 ml de PBS.

4.2. Células humanas

Para estudiar la expresión génica de las células de piel humana se emplearon queratinocitos y fibroblastos para representar la epidermis y dermis respectivamente. Las células de ambas líneas celulares se obtuvieron de una biopsia cedida por un donante y procesada por el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias de acuerdo con la ley española (RD9/2014), reguladora de la utilización de órganos y tejidos para la clínica.

4.2.1. Fibroblastos

Para el cultivo de los fibroblastos se empleó un medio de cultivo de fibroblastos compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Gibco), suero bovino fetal, y dos antibióticos: penicilina G y estreptomicina.

4.2.2. Queratinocitos

Para el cultivo de los queratinocitos se empleó un medio específico para queratinocitos compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/HAM-F12 (3/1)), suero bovino fetal, insulina, triiodotironina, EGF, toxina colérica y adenina. El cultivo de queratinocitos requiere también la ayuda de células "feeder", fibroblastos de la línea celular 3T3 sometidas a una irradiación letal. Estas células facilitan la correcta diferenciación y crecimiento de los queratinocitos.

4.3. Ensayo de adherencia

Para la realización del experimento, ambas líneas celulares fueron cultivadas en placas de 6 pocillos previamente esterilizadas (Thermo Fisher Scientific), incubadas a 37°C con una atmósfera enriquecida al 5% de CO₂. Una vez alcanzada una confluencia del 70-90%, se retiró el medio de las placas de cultivo y se realizó un lavado con PBS para eliminar cualquier resto y células no viables. Para bloquear los sitios de unión célula-levadura inespecíficos, se añadió a cada pocillo 1 ml de FBS al 10% en PBS y las placas se volvieron a incubar 1 hora a 37°C con una atmósfera enriquecida al 5% de CO₂.

Posteriormente, se añadieron los cultivos fúngicos. Se emplearon 400 µl de cada suspensión fúngica para inocular los pocillos de las placas celulares. Se reservó siempre un pocillo sin la adición de un hongo a modo de control. Los pocillos se completaron hasta un volumen de 2 ml empleando medio de queratinocitos y medio de fibroblastos

respectivamente. Tras una incubación a 37°C durante dos horas, se lavaron los pocillos con PBS para eliminar las células fúngicas no unidas a la superficie celular y se volvió a completar los pocillos hasta 2 ml con los medios de crecimientos correspondientes. Finalmente, se volvieron a incubar las placas a 37°C con una atmósfera enriquecida al 5% de CO₂ durante una noche.

4. 4. Extracción de ARN

Para obtener el ARN de ambas líneas celulares, se retiró el medio de cultivo de las placas y se realizaron varios lavados con PBS. Para la extracción del ARN se utilizó el kit comercial “RNeasy Mini Kit” (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Con el fin de evitar la contaminación de las muestras se eliminaron los posibles restos de ADN residual con una ADNasa libre de ARNasas (Qiagen). Para cuantificar la concentración del ARN obtenido de las muestras se recurrió al uso de un espectrofotómetro para microvolúmenes picodrop (Picodrop, UK).

4.5. Reacción de Transcripción Inversa (RT-PCR)

A partir del ARN purificado en el paso anterior se obtuvo el ADNc a través de una reacción de transcripción inversa (RT-PCR). Se recurrió al kit comercial “High Capacity cDNA Reverse Transcription” de Applied Biosystems, siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción contenía:

- 2 µl de mezcla de cebadores.
- 2 µl de tampón.
- 0,8 µl de dNTPs.
- 0,5 µl de transcriptasa inversa.
- 2 µg de ARN purificado.
- H₂O (suficiente para alcanzar un volumen final de 20 µl).

La reacción se realizó en un termociclador a 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 segundos a 85°C. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta ser retirados del termociclador.

4.6. PCR a Tiempo Real (Q-PCR)

Una vez obtenido el ADNc, se procedió a estudiar las variaciones en la expresión en los genes de interés en los fibroblastos y queratinocitos cultivados.

	Gen	Secuencia de los cebadores (primers)
Polimerización KS	<i>B3GNT7</i>	Directo 5' -GCCGGGAAGAGGAAAGTCG-3' Reverso 5' -TTCTTCCACAGCGACATGGC-3'
	<i>B4GALT4</i>	Directo 5' -CCCTTCTGTGTCTCCTTACCTCA-3' Reverso 5' -AGGATGGCGACCCTCTGTAA-3'
Modificadores KS	<i>CHST1</i>	Directo 5' -AGACTTTCTCCCCAGCTGCA-3' Reverso 5' -GGGAGTCCACAGCCACCA-3'
	<i>CHST6</i>	Directo 5' -AGCAGCCCTGGACAGTGG-3' Reverso 5' -AGAGGAGGAGGAAGGTCTGC-3'
HK	<i>GAPDH</i>	Directo 5' -GAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3' Reverso 5' -GTTACACCCATGACGAACA-3'

Tabla 1: Secuencia de oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes codificantes de KS y el gen GAPDH

Para ello se utilizó el kit “PowerSYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La mezcla de reacción fue realizada según las instrucciones del fabricante, conteniendo:

- 5 µl de reactivo SYBR.
- 2 µl de H₂O.
- 1 µl del ADNc obtenido en la RT-PCR.
- 2 µl de primers de oligonucleótidos directos y reversos (**Tabla 1**).

Se seleccionó el gen GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como gen control o “housekeeping” (HK), ya que su expresión es constitutiva y constante en las células estudiadas.

Para realizar esto se realizaron reacciones Q-PCR en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo, utilizando el termociclador “Real Time ABI Prism Detection System Device” de Applied Biosystems. El programa consistió en 10 minutos a 95°C, 50 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C y finalmente 60 segundos a 60°C.

4.7. Tratamiento de datos

Para el estudio de los datos obtenidos se emplearon los programas AppliedBiosystems SDS 2.3. y Manager 1.3. Para comparar los resultados de la expresión de los genes estudiados en los fibroblastos y queratinocitos inoculados frente a los cultivos control se realizó la prueba T-student utilizando el programa “Statistica” para Windows (Statsoft Inc.). Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

5. Resultados

El objetivo del trabajo fue estudiar las alteraciones producidas por dos hongos en la expresión cuatro genes importantes para la polimerización y modificación del KS (**Tabla 1**). Se seleccionaron cuatro de los genes de mayor importancia: *B3GNT7*, *B4GALT4*, *CHST1* y *CHST6*. Como modelos se utilizaron dos líneas celulares humanas a modo de representación de un epitelio: queratinocitos como representantes de la epidermis y fibroblastos como representantes de la dermis.

5.1. Análisis de la expresión diferencial de *B3GNT7*, *B4GALT4*, *CHST1* y *CHST6* en queratinocitos.

Condición experimental	ng ARN queratinocitos
Control	14970
<i>C. albicans</i>	7233
<i>C. parapsilosis</i>	18240

Tabla 2: Cantidad de ARN obtenida en los queratinocitos en las diferentes condiciones experimentales

A partir del ARN aislado de los queratinocitos (**Tabla 2**) según el método descrito e el apartado **4.4.** se obtuvo el ADNc a través de una RT-PCR. Esto se empleó para realizar una Q-PCR y estudiar la expresión de los cuatro genes de interés en los queratinocitos en tres condiciones: en ausencia de las levaduras, tras el contacto con *C. albicans* y tras el contacto con *C. parapsilosis*.

De los cuatro genes, se expresaron solamente tres. La expresión de *CHST1* (**Fig. 4**, **Fig. 5**) no fue detectada bajo ninguna condición experimental.

En los queratinocitos cultivados en contacto con *C. albicans*, el único gen expresado sin cambios significativos respecto al control fue *CHST6* (**Fig. 4**). Tanto *B3GNT7* como *B4GALT4* mostraron alteraciones significativas:

- *B3GNT7* vio su expresión aumentada más de 7 veces con respecto al cultivo control ($p < 0,05$), y este fue el único ejemplo de un aumento en la expresión de un gen en ambos linajes celulares estudiados (**Fig. 4**).
- *B4GALT4* vio su expresión reducida en un 58% en comparación con el control ($p < 0,05$) (**Fig. 4**).

En los queratinocitos cultivados en contacto con *C. parapsilosis* solamente se vio alterada la expresión del único gen que en *C. albicans* no se había visto modificada: el gen *CHST6* vio su actividad reducida un 62% respecto al control ($p < 0,05$) (**Fig. 4**).

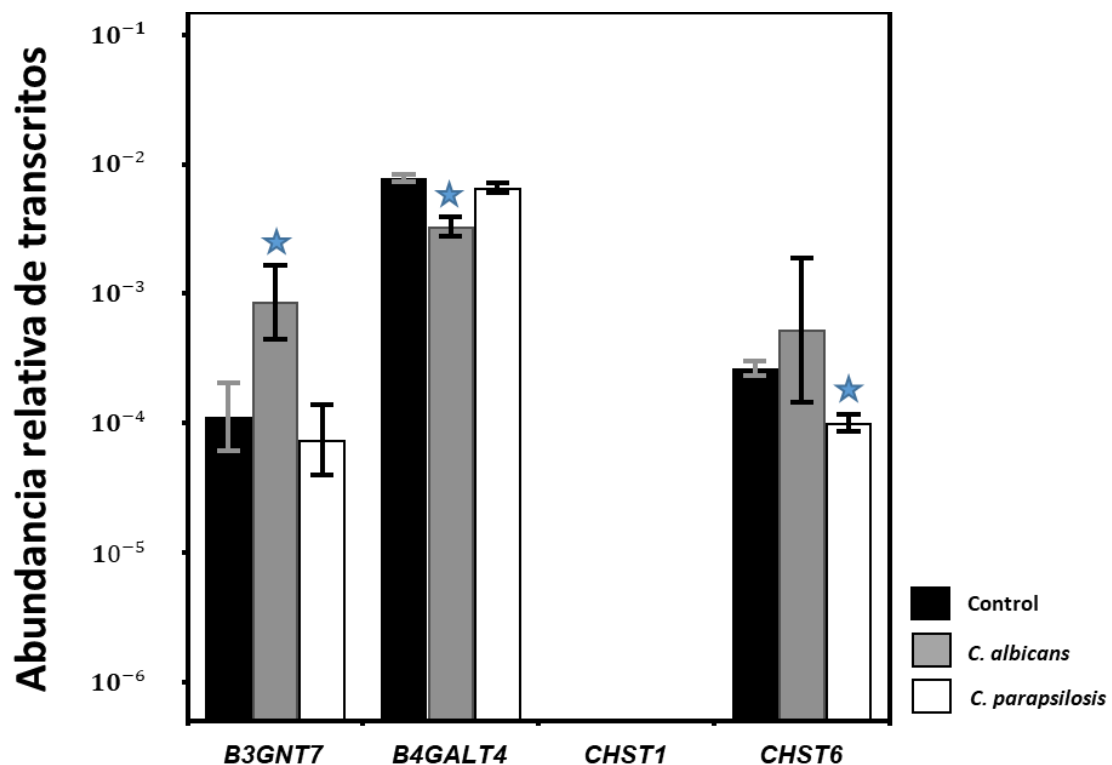


Figura 4: Transcripción diferencial de los genes responsables de la polimerización y modificación del KS en queratinocitos en presencia de *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Se muestra la abundancia relativa del ARNm de cada gen en las diferentes condiciones experimentales en escala logarítmica. Las estrellas azules marcan expresiones alteradas significativamente de los genes ($p < 0,05$). Las barras de error representan la desviación típica.

5.2. Análisis de la expresión diferencial de *B3GNT7*, *B4GALT4*, *CHST1* y *CHST6* en fibroblastos.

De los cultivos de fibroblastos se obtuvieron las cantidades de ARN estipuladas en la **Tabla 3**. Con este ARN se realizaron las mismas técnicas que con los queratinocitos, culminando en el análisis estadístico de los resultados de una Q-PCR.

Condición experimental	ng ARN fibroblastos
Control	16308
<i>C. albicans</i>	9426
<i>C. parapsilosis</i>	10977

Tabla 3: Cantidad de ARN obtenida en fibroblastos en las diferentes condiciones experimentales

En los fibroblastos se vio alterada la expresión de un único gen en presencia tanto de *C. albicans* como *C. parapsilosis*. En el caso de los fibroblastos cultivados en contacto con *C. albicans*, B4GALT4 vio su expresión reducida en torno a un 73% respecto a la normal ($p < 0,05$) (**Fig. 5**), mientras que en contacto con *C. parapsilosis*, la expresión se redujo un 60% respecto a la normal ($p < 0,05$) (**Fig. 5**). No se apreciaron cambios estadísticamente significativos en la expresión de los otros dos genes tras el contacto de las levaduras con los fibroblastos.

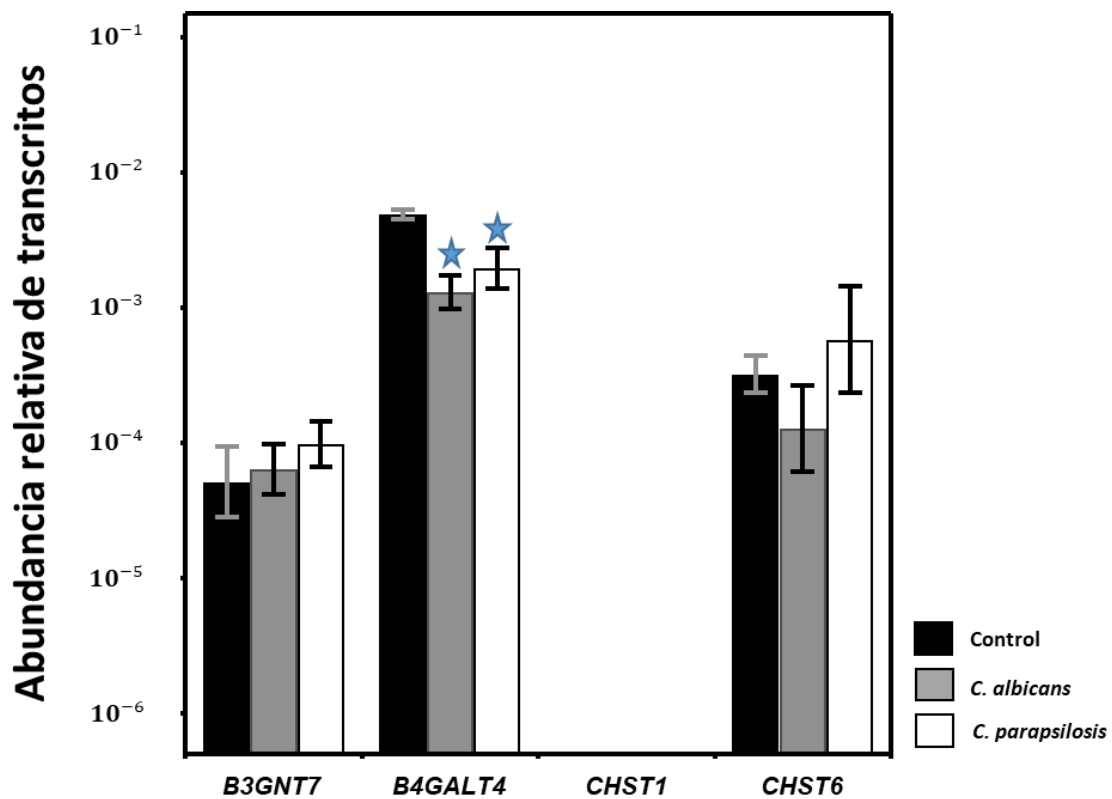


Figura 5: Transcripción diferencial de los genes responsables de la polimerización y modificación del KS en fibroblastos en presencia de *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Se muestra la abundancia relativa del ARNm de cada gen en las diferentes condiciones experimentales en escala logarítmica. Las estrellas azules marcan expresiones alteradas significativamente de los genes ($p < 0,05$). Las barras de error representan la desviación típica.

6. Discusión

El estudio de la expresión de los genes *B3GNT7*, *B4GALT4*, *CHST1* y *CHST6* en poblaciones de queratinocitos y fibroblastos en presencia de las dos especies de hongos *C. albicans* y *C. parapsilosis* dejó en evidencia una alteración en los patrones normales de expresión en los genes involucrados en la síntesis del KS.

De los cuatro genes estudiados, *CHST1* no se expresó en ninguno de los cultivos celulares. *CHST1*, o *carbohydrate sulfotransferase 1*, es el gen responsable de la síntesis de CHST1, responsable de la sulfatación de los residuos de Gal internos de KS, y cuya expresión es predominante en tejidos como la córnea y cerebro, lo que podría explicar la ausencia de su expresión en este trabajo. En el futuro sería de utilidad estudiar la actividad de *CHST3*, paróloga de *CHST1* y responsable de la síntesis de CHST3, encargada de la sulfatación de Gal en el condroitín sulfato. CHST3 ha sido descrita reemplazando la actividad de CHST1 en KS fuera de la córnea (Ohmae *et al.*, 2019).

De las dos líneas celulares estudiadas, los queratinocitos fueron los que más alteraciones mostraron. Sumando las dos especies de *Candida spp.* utilizadas, todos los genes expresados fueron alterados. *C. albicans* causó alteraciones tanto en la expresión de *B3GNT7* como en la de *B4GALT4*, ambas las responsables de la síntesis de la cadena polisacáridica principal del KS. Curiosamente, la expresión de *B3GNT7* en queratinocitos en presencia de *C. albicans* fue el único ejemplo de sobreexpresión en el estudio. Es posible que la sobreexpresión de transferasas de N-acetilglucosamina sea beneficioso para el hongo, puesto que GlcNAc representa una fuente de carbono abundante. (Du *et al.*, 2020).

CHST6 fue el único gen alterado por *C. parapsilosis* en queratinocitos, sufriendo una subexpresión en comparación con el cultivo control.

En el cultivo de fibroblastos solo se observó cambios en la expresión del gen *B4GALT4*. El gen sufrió una subexpresión en contacto con ambas especies de *Candida*, siendo mayor tras la unión con *C. albicans*.

Mientras que *Candida sp.* suele producir enfermedades cutáneas, también es responsable de patologías oculares como la queratitis ocular micótica. La queratitis es una inflamación de la córnea y en casos graves puede llevar a la ceguera. Globalmente,

la queratitis infecciosa es la quinta causa más importante de ceguera (Cabrera-Aguas *et al.*, 2022). KSPGs como lumicano y queratocano están implicados en la resolución de los procesos inflamatorios en la córnea (Pomin, 2015). Además, la integridad estructural de KS es importante para la correcta organización de las fibrillas del estroma corneal (Cateron & Melrose, 2018). La alteración de la síntesis de KS y de la función de sus PGs podría estar relacionada con la inflamación patológica y la opacidad corneal en las queratitis oculares micóticas.

De las dos especies de *Candida*, fue *C. albicans* la que mayor número de cambios produjo. Esto se podría deber a que *C. albicans* es más virulenta y posee ciertas ventajas frente a *C. parapsilosis* (Mba & Nweze, 2020). Su existencia como miembro de la microbiota normal de la piel, además de su formación de hifas verdaderas podría estar ligado al mayor número de alteraciones en la línea de queratinocitos, representantes de la epidermis. Sin embargo, la importancia de KS en la epidermis no ha sido ampliamente estudiada. Por otro lado, ambas especies de hongo afectaron al gen *B4GALT4* en los fibroblastos. La síntesis de KS corneal es mediada en gran parte por fibroblastos especializados denominados queratocitos. En un futuro sería útil repetir el experimento con queratocitos para comprobar si sufren las mismas alteraciones en contacto con ambas levaduras: la alteración de *B4GALT4* podría tener un efecto sinérgico con la disrupción de la arquitectura fibrilar de la córnea durante la inflamación en la queratitis ocular micótica. Existe también la posibilidad de que las alteraciones en la estructura de KS estén relacionadas con la patogenia de *Candida spp.* en la piel. Como se mencionó en el **Apartado 1**, *Candida spp.* emplea enzimas hidrolíticas como SAP para facilitar su penetración en la piel, alterando la estructura normal de la MEC. El papel de KS en los procesos inmunológicos epiteliales no ha sido estudiada, pero la alteración de los genes responsables de su polimerización y modificación en fibroblastos y queratinocitos epiteliales podría indicar que el GAG tiene importancia en el desarrollo de las candidiasis epiteliales.

7. Conclusiones

Tras el análisis de los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. Tanto *C. albicans* como *C. parapsilosis* alteran la expresión de genes relacionados con la polimerización del KS en representantes de la epidermis (queratinocitos) y dermis (fibroblastos) humana.
2. *C. albicans* produce un mayor número de alteraciones que *C. parapsilosis*.
3. La mayor parte de las alteraciones producen subexpresiones, exceptuando *B3GNT7*.
4. En fibroblastos, tanto *C. albicans* como *C. parapsilosis* producen una subexpresión en *B4GALT4*.

Referencias

- Abdallah, F., Mijouin, L., & Pichon, C. (2017). Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. *Mediators of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5095293>.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (Sixth). Garland Science.
- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. In *Journal of Fungi*, 3(4), 57. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: Human fungal infections. In *Science Translational Medicine*, 4, 165 <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>.
- Cabrera-Aguas, M., Khoo, P., & Watson, S. L. (2022). Infectious keratitis: A review. In *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 50(5), 543-562. <https://doi.org/10.1111/ceo.14113>.
- Caterson, B., & Melrose, J. (2018). Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability. *Glycobiology*, 28(4), 182–206. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWY003>.
- Couchman, J. R., & Pataki, C. A. (2012). An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 60(12), 885–897. <https://doi.org/10.1369/0022155412464638>.
- Du, H., Ennis, C. L., Hernday, A. D., Nobile, C. J., & Huang, G. (2020). N-acetylglucosamine (GlcnaC) sensing, utilization, and functions in candida albicans. In *Journal of Fungi*, 6(3), 1-12. <https://doi.org/10.3390/jof6030129>.
- Egert, M., & Simmering, R. (2016). The microbiota of the human skin. *Microbiota of the human body: implications in health and disease*, 61-81. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_5.

- Funderburgh, J. L. (2000). MINI REVIEW Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. In *Glycobiology*, 10(10), 951-958. <https://doi.org/10.1093/glycob/10.10.951>.
- Funderburgh, J. L. (2002). Keratan Sulfate Biosynthesis. *IUBMB Life*, 54(4), 187–194. <https://doi.org/10.1080/15216540290114469>.
- Gauthier, G. M. (2015). Dimorphism in Fungal Pathogens of Mammals, Plants, and Insects. *PLoS Pathogens*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004608>.
- Gauthier, G. M. (2017). Fungal dimorphism and virulence: Molecular mechanisms for temperature adaptation, immune evasion, and in vivo survival. *Mediators of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8491383>.
- Gow, N. A. R., Latge, J.-P., & Munro, C. A. (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum*, 5(3), 5-3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016>.
- Hirano, K., Ohgomori, T., Kobayashi, K., Tanaka, F., Matsumoto, T., Natori, T., Matsuyama, Y., Uchimura, K., Sakamoto, K., Takeuchi, H., Hirakawa, A., Suzumura, A., Sobue, G., Ishiguro, N., Imagama, S., & Kadomatsu, K. (2013). Ablation of Keratan Sulfate Accelerates Early Phase Pathogenesis of ALS. *PLOS ONE*, 8(6), e66969. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0066969>.
- Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. In *Matrix Biology* 42, 11-55. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003>.
- Jones, C. L., Liu, J., & Xu, D. (2010). 6.14 Structure, Biosynthesis, and Function of Glycosaminoglycans. In L. Mander & H. Liu (Eds.), *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology* (Vol. 6). Elsevier Science BV.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2019). *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed.). Pearson Education Limited.

- Mba, I. E., & Nweze, E. I. (2020). Mechanism of Candida pathogenesis: revisiting the vital drivers. In *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 39(10), 1797-1819. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03912-w>.
- Nguyen, U. T., & Kalan, L. R. (2022). Forgotten fungi: the importance of the skin mycobiome. *Current Opinion in Microbiology*, 70. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2022.102235>.
- Ohmae, M., Yamazaki, Y., Sezukuri, K., & Takada, J. (2019). Keratan Sulfate, a “Unique” Sulfo-Sugar: Structures, Functions, and Synthesis. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 31(183). <https://doi.org/10.4052/tigg.1830.1E>.
- Ordiales, H., Alcalde, I., Vázquez, F., Merayo-Llodes, J., Quirós, L. M., & Cueto, C. M. (2022). Cell Surface Glycosaminoglycans as Receptors for Adhesion of Candida spp. to Corneal Cells. *Polish Journal of Microbiology*, 71(1), 55–62. <https://doi.org/10.33073/pjm-2022-008>.
- Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., & Bennett, R. J. (2013). Emerging and Emerged Pathogenic Candida Species: Beyond the Candida albicans Paradigm. *PLoS Pathogens*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003550>.
- Pomin, V. H. (2015). Keratan sulfate: An up-to-date review. In *International Journal of Biological Macromolecules* 72, 282-289. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.029>.
- Prydz, K. (2015). Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. *Biomolecules*, 5(3), 2003-2022. <https://doi.org/10.3390/BIOM5032003>.
- Quantock, A. J., Young, R. D., & Akama, T. O. (2010). Structural and biochemical aspects of keratan sulphate in the cornea. In *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(6) 891-906. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0228-7>.
- Ricard-Blum, S., & Perez, S. (2022). Glycosaminoglycan interaction networks and databases. In *Current Opinion in Structural Biology* 74. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102355>.

- Richardson, J. P., Ho, J., & Naglik, J. R. (2018). Candida–Epithelial Interactions. *Journal of Fungi*, 4(1), 22. <https://doi.org/10.3390/JOF4010022>.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2016). *Histology: A Text and Atlas: with correlated Cell and Molecular Biology* (7th ed.). Wolters Kluwer Health.
- Tachibana, K., Ohkawa, Y., Kanto, N., Maeda, K., Ohe, S., Isei, T., Harada, Y., & Taniguchi, N. (2022). The expression of keratan sulfate in malignant melanoma enhances the adhesion and invasion activity of melanoma cells. *The Journal of Dermatology*, 49(10), 1027–1036. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.16506>.