



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“El papel de la desacetilasa de histonas Hst1p en
la Respuesta a Estrés Oxidante y Resistencia a
Fluconazol en *Candida glabrata*”**

Tesis que presenta
Emmanuel Orta Zavalza

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

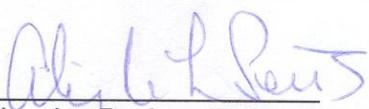
Director de la Tesis:
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

San Luis Potosí, S.L.P., Julio del 2009

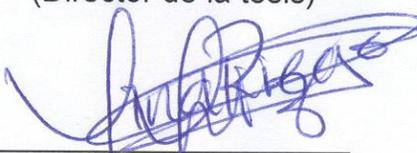


Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**El papel de la desacetilasa de histonas Hst1p en la Respuesta a Estrés Oxidante y Resistencia a Fluconazol en *Candida glabrata***” presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Emmanuel Orta Zavalza** y aprobada el **10 de Julio del 2009** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



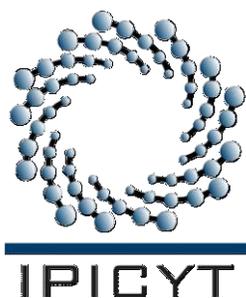
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
(Director de la tesis)



Dr. Lina Raquel Riego Ruiz
(Asesor de la tesis)



Dr. J. Sergio Casas Flores
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Alejandro De Las Peñas Nava.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 211443.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 061 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 10 días del mes de julio del año 2009, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Presidenta	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Emmanuel Orta Zavalza

sobre la Tesis intitulada:

El papel de la desacetilasa de histonas Hst1p en la Respuesta a Estrés Oxidante y Resistencia a Fluconazol en Candida glabrata.

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 10 días del mes de julio de 2009.

Mtra. Ivonne Lize de Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Manuel Bonilla
Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

Para mis padres, Celia Zavalza y Manuel Orta.

A mis maestras, Silvia y Alicia Zavalza.

A mi inspiración, Benita Ortega

A Cristina Zavala y Sergio Zavalza.

Mis hermanos Josué y Nayeli Orta.

Y para mis abuelos.

“[Un Absoluto] viene a ser ese momento en que algo logra su máxima profundidad, su máximo alcance, su máximo sentido, y deja por completo de ser interesante.”

Julio Cortázar.

Agradecimientos

Al Dr. Alejandro De Las Peñas, por su confianza, paciencia y sus valiosas enseñanzas.

A la Dra. Irene Castaño y el Dr. Omar Arroyo, por sus enriquecedores comentarios.

A la Dra. Lina Riego y al Dr. Sergio Casas por su pertinente asesoría.

A los profesores de la División de Biología Molecular por sus acertadas aportaciones.

A mi familia, por su infinita paciencia y afecto.

En especial a Benita Ortega, por su cariño y apoyo incondicional.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio 6 y de la generación 2007-2009.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Contenido

Carátula.....	i
Constancia de aprobación de la tesis.	ii
Créditos institucionales.....	iii
Acta de examen.....	iv
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos.	vi
Lista de tablas.	x
Lista de figuras.....	xi
Lista de anexos.	xiii
Abreviaturas.	xiv
Glosario.....	xviii
Resumen.	xix
Abstract.....	xx

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El patógeno emergente <i>Candida glabrata</i>	1
1.2 Relación filogenética entre <i>C. glabrata</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1.3 Factores de virulencia en <i>C. glabrata</i>	4
1.3.1 Adhesinas epiteliales.....	4
1.3.2 Secreción de hidrolasas.	5
1.3.3 Reguladores transcripcionales.	6
1.4 <i>Candida glabrata</i> desarrolla resistencia a los azoles.	7
1.4 Respuesta del hospedero contra <i>C.glabrata</i>	9
1.5 El metabolismo aerobio y las especies reactivas de oxígeno.....	10
1.6 Las ERO como moléculas de señalización.	11

1.7 Respuesta a estrés oxidante.....	14
1.8 Envejecimiento, estrés oxidante y sirtuinas.....	16
1.9 La desacetilasa de histonas Hst1p.....	24
2 MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Medios de cultivo y cepas de <i>Escherichia coli</i>	29
2.2 Cepas de <i>C. glabrata</i>	30
2.3 Plásmidos.....	31
2.4 Oligonucleótidos.....	34
2.5 Transformación genética de <i>C. glabrata</i>	35
2.6 Ensayos de sensibilidad a peróxido de hidrógeno.	36
2.7 Ensayos de sensibilidad a fluconazol.....	38
2.8 Curvas de crecimiento.....	39
2.9 Kits comerciales.	39
2.10 Análisis bioinformáticos.....	39
2.11 Transformación génica de <i>E. coli</i>	40
2.12 Extracción de ADN genómico de <i>C. glabrata</i>	41
2.13 Purificación de ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y precipitación con etanol.....	41
2.14 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	42
2.15 Cuantificación de ADN.	43
3 RESULTADOS	
3.1 Generación de la cepa mutante doble <i>sir2Δ hst1Δ</i>	44
3.2 Hst1p y Sum1p regulan negativamente la respuesta a estrés oxidante en fase de crecimiento exponencial.....	44
3.3 La catalasa media la respuesta a estrés oxidante en ausencia de Hst1p.	46
3.4 Mutaciones en <i>HST1</i> o <i>SUM1</i> incrementan el tiempo de duplicación en fase logarítmica.....	48
3.5 La resistencia a fluconazol se incrementa en ausencia de <i>HST1</i> o <i>SUM1</i>	49
3.6 Construcción de vectores para el marcaje con epítomos.....	52

3.7 Las cepas <i>hst1Δ</i> y <i>sum1Δ</i> pierden el fenotipo de lento crecimiento en el medio casaminoácidos.....	56
3.8 Fusión de <i>HST1</i> con <i>GFP</i> y <i>c-Myc13</i>	59
3.9 La secuencia del represor Sum1p de <i>C. glabrata</i> es notablemente distinta a la del ortólogo de <i>S. cerevisiae</i>	65
4 DISCUSIÓN	70
5 CONCLUSIONES	77
6 PERSPECTIVAS	78
7 REFERENCIAS	81
8 ANEXOS	87

Lista de tablas

1. Características bioquímicas de las ERO.	11
2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> .	28
3. Cepas de <i>Candida glabrata</i> .	30
4. Plásmidos.	31
5. Oligonucleótidos.	34
6. Genes implicados en la REO que se sobreexpresan en la cepa <i>hst1Δ</i> .	45
7. Genes controlados negativamente por CgHst1p y que al sobreexpresarse en <i>S. cerevisiae</i> afectan el crecimiento.	47
8. Genes que confieren resistencia a fluconazol y se inducen en la cepa <i>hst1Δ</i> .	50
9. Transportadores de nutrientes que se inducen en la cepa <i>hst1Δ</i> .	73

Lista de figuras

1. Distribución de las especies causantes de las candidemias en el periodo 2001-2004 en Norte América.	1
2. Árbol filogenético de las especies en los clados de <i>Candida</i> y de <i>Saccharomyces</i> .	3
3. Algunos mecanismos que confieren resistencia a azoles en <i>C. glabrata</i> .	8
4. Los orígenes y blancos celulares de las principales ERO.	12
5. Envejecimiento replicativo y cronológico en levadura.	17
6. La asimetría de la división se pierde en células madre seniles y en ausencia de Sir2p.	20
7. Vías regulatorias de longevidad en <i>S. cerevisiae</i> y el papel dual de Sir2p.	22
8. Árbol filogenético de las sirtuinas en <i>S. cerevisiae</i> .	24
9. Segmento comparativo del alineamiento múltiple de secuencias proteicas de sirtuinas y sus ortólogos en otras especies de levaduras	28
10. Representación esquemática de los ensayos de sensibilidad a H ₂ O ₂ .	37
11. Representación esquemática de los ensayos de sensibilidad a fluconazol en fase estacionaria.	38
12. <i>HST1</i> y <i>SUM1</i> regulan negativamente la REO en fase exponencial.	45
13. El incremento en la resistencia a H ₂ O ₂ en <i>hst1Δ</i> es mediado por la catalasa.	46
14. En ausencia de <i>SUM1</i> y <i>HST1</i> , el tiempo de duplicación se extiende 2,2 veces más en medio YPD.	49
15. Hst1p y Sum1p, ejercen un control negativo sobre genes de resistencia a fluconazol en fase estacionaria.	51
16. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos con los epítomos <i>GFP</i> (pOZ16) y <i>c-Myc13</i> (pOZ18).	52
17. Representación esquemática del pOZ16 (<i>GFP</i>).	54
18. Representación esquemática del pOZ18 (<i>c-Myc13</i>).	55
19. Las cepas mutantes <i>hst1Δ</i> o <i>sum1Δ</i> con o sin la fusión <i>HST1::c-Myc13</i> , se replican a la misma velocidad que la cepa silvestre en el medio CAA.	57
20. Las mutantes <i>hst1Δ</i> y <i>sum1Δ</i> no presentan un fenotipo de lento crecimiento en el medio CAA.	58
21. Generación de vectores para reemplazo génico con fusiones traduccionales.	60
22. Fusión con epítomos por un sólo paso (doble recombinación homóloga).	61

23.	Fusión con epítomos por dos pasos (integración y resolución).	62
24.	Ubicación de los oligonucleótidos para comprobar el reemplazo génico con la fusión traduccional.	63
25.	Remoción del casete de resistencia a higromicina con incorporación simultánea del terminador nativo.	64
26.	Árbol filogenético de secuencias Sum1p de hemiascomicetos.	66
27.	Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de Sum1p por clustalW.	69
28.	Modelo de la inducción de un estado protector celular mediante la remoción temporal del control negativo de las sirtuinas.	76

Anexos

S1	La ausencia de <i>HST1</i> aparentemente incrementa la respuesta antioxidante en fase estacionaria.	91
S2	Electroferogramas de las fusiones traducciones de <i>HST1::GFP</i> (pOZ30) y <i>HST1::c-Myc13</i> (pOZ32).	92
S2	Diagnóstico por PCR de los reemplazos génicos de <i>HST1</i> con las fusiones traduccionales.	93

Abreviaturas

5-FOA	Ácido 5-fluorótico, del inglés <i>5-FluOrotic Acid</i> .
ABC	Casete de unión a ATP, del inglés <i>ATP Binding Cassette</i> .
ADN	Ácido D esoxirribo N ucleico.
AN	A cido N icotínico.
ARE	Elemento de respuesta a <i>AP-1</i> , del inglés <i>AP-1 Response Element</i> , (TGACTAA)
ATP	Trifosfato de adenosina, del inglés <i>Adenosine TriPhosphate</i>
CAA	Medio casaminoácidos, del inglés <i>CasAminoAcids</i> .
Cg	Referente a <i>Candida glabrata</i> .
ChIP	Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina, del inglés <i>Chromatin ImmunoPrecipitation</i>
ERC	Círculo extracromosómico de ADN ribosomal, del inglés <i>Extrachromosomal RDNA Circle</i> .
ERO	Especies R eactivas de O xígeno.
FLC	FL u C onazol.
FRT	Secuencias de reconocimiento de recombinasa Flp1p, del inglés <i>Flippase Recognition Target</i> (GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC)
GPI	Glicosil-fosfatidilinositol, del inglés <i>Glycosyl PhosphatidyInositol</i> .
GSH	Glutación, tripéptido formado por glicina, cisteína y ácido glutámico.
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno.
MFS	Superfamilia facilitadora principal, del inglés <i>Major Facilitator Superfamily</i>
MSE	Elemento de la esporulación intermedia, del inglés <i>Middle Sporulation Element</i> (AGYGCACAAAAC o GYGCASWAAW).
NAD⁺	N icotin A denin D inucleotido. NADH corresponde a la forma reducida. El NADP ⁺ es la forma fosforilada y también puede reducirse (NADPH)
NAM	N icotín A Mida
NR	R ibósido de N icotinamida
O₂^{•-}	Radical superóxido.
OD_{600nm}	Densidad óptica registrada a la longitud de onda de 600nm. Del inglés <i>Optical Density</i> , y equivale a la absorbancia en este punto del espectro visible (<i>A_{600nm}</i>).

OH[•]	Radical hidroxilo.
ORF	Marco abierto de lectura, del inglés Open Reading Frame .
OSRE	Elemento de respuesta a estrés oxidante, del inglés, Oxidative Stress Response Element ; (GNCNNGSCS).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés Polymerase Chain Reaction .
PDE	Elemento de cambio posdiáuxico, del inglés PostDiauxic Shift Element , (AWAGGGAT).
PDRE	Elemento de respuesta a fármacos pleiotrópicos, del inglés Pleiotropic Drug REsistance , (CCGCCGRAWR).
PMN	Leucocitos PoliMorfoNucleares
REO	Respuesta a Estrés Oxidante .
RT-PCR	Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa, del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction .
Sc	Referente a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
STRE	Elemento de respuesta a estrés, del inglés STress Response Element ; (AAGGGG o MAGGGGSGG).
YPD	Medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa. Yeast extract-Peptone-Dextrose .
YRE	Elemento de respuesta a Yap1p, del inglés Yap1p Response Element ; (TTACTAA, TTAGTMAGC y TTAStMA).

Nombres de genes

ACE	Activator of CUP1 Expression .
AGP	High-Affinity Glutamine Permease .
ATR	AminoTriazole Resistance .
AUS	ABC protein involved in Uptake of Sterols .
AVT	Amino acid Vacuolar Transport .
BAP	Branched-chain Amino acid Permease .
bla	Beta-lactamase .
CDR	Candida Drug Resistance .
CTA	CaTalase A .
CTS	ChiTinaSe .
CTT	CaTalase T .
DDR	DNA Damage Responsive .
DIP	DIcarboxylic amino acid Permease .

EPA	EP ithelial A dhesin
ERG	ERG osterol biosynthesis
FLR	FL uconazole R esistance.
FUR	5- FIUoR ouridine sensitivity.
GFP	G reen F luorescent P rotein.
GIS	glg1-2 S uppressor.
GPD	G lycerol-3- P hosphate D ehydrogenase.
HIS	HIS tidine requiring.
hph	H ygromycin ph osphotransferase.
HST	H omologous of SIR Two .
HXT	HeX ose T ransporter.
MCH	MonoC arboxylate transporter- H omologous.
MGR	Mitochondrial G enome R equired.
MSN	M ulticopy suppressor of SNF1 mutation.
Myc	Myelocytomatosis oncogene.
NCE	NonC lassical E xport.
NDE	NADH D ehydrogenase E xternal
NDI	NADH D ehydrogenase I nternal.
NOX	N eutrophil OX idase.
PCK	3- P hospho G lycerate K inase
PDH	P leiotropic D rug H omolog
PDR	P leiotropic D rug R esistance.
PKA	P rotein K inase A .
PLB	P hospho L ipase B .
PPZ	P rotein P hosphatase Z .
PUT	P roline U Tilization.
QDR	Q uini D ine R esistance.
RAP	R epressor A ctivator P rotein.
RAS	H omologous to RAS protooncogene.
RCK	R adiation sensitivity C omplementing K inase.

RGT	<i>Restores Glucose Transport.</i>
RIF	<i>RAP1 Interacting Factor.</i>
RIM	<i>Regulator of IME2.</i>
SAP	<i>Secreted Aspartyl Protease.</i>
SCH	<i>Suppressor of CHitin synthase disruption.</i>
SED	<i>Suppression of Exponential Defect.</i>
SIR	<i>Silent Information Regulator.</i>
SKN	<i>Suppressor of KRE Null..</i>
SOD	<i>SuperOxide Dismutase.</i>
STE	<i>STerile.</i>
SWI	<i>SWitching deficient.</i>
THI	<i>THiamine metabolism.</i>
TNA	<i>Transporter of Nicotinic Acid.</i>
TNR	<i>Transporter of Nicotinamide Riboside.</i>
TOR	<i>Target Of Rapamycin</i>
UBI	<i>UBiquitin.</i>
URA	<i>URacil requiring.</i>
XBP	<i>XhoI site-Binding Protein.</i>
YAP	<i>Yeast Activator Protein.</i>
YBT	<i>Yeast Bile Transporter.</i>
YKU	<i>Yeast KU protein.</i>
YOR	<i>Yeast Oligomycin Resistance</i>

Glosario

Árbol génico: Diagrama ramificado que representa las relaciones conocidas o inferidas de un grupo de genes o secuencias de aminoácidos históricamente relacionados.

Comensalismo: Relación interespecífica entre dos organismos vivientes, donde uno de los individuos se beneficia y el otro no se es perjudicado ni favorecido.

Epistasis: Interacción entre los productos de dos genes en el cual un gen interfiere la expresión fenotípica del otro.

Especiación: Proceso mediante el cual una población de una determinada especie da lugar a otra u otras poblaciones, aisladas reproductivamente de la población anterior y entre sí, que con el tiempo irán acumulando otras diferencias genéticas.

Filogenia: La secuencia de eventos involucrados en el desarrollo evolutivo de una especie o un grupo taxonómico de organismos.

Filogenia: Referente a las relaciones evolutivas entre un grupo de organismos.

Homólogo: Un gen relacionado a otro gen por descender de una secuencia ancestral de ADN.

Oportunista: Denota a un microorganismo que no causa ordinariamente enfermedad, pero que bajo ciertas circunstancias se vuelve patogénico.

Ortólogo: Genes en diferentes especies que evolucionaron a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los genes ortólogos retienen la misma función a lo largo de la evolución.

Parálogo: Genes relacionados por la duplicación dentro de un genoma. Por lo general genes parálogos evolucionan nuevas funciones, incluso si están relacionadas a la original.

Patogenicidad: La capacidad potencial de producir enfermedad o cambios patológicos en un hospedero.

Sintenia: Es la localización conservada de genes en posiciones equivalentes en especies relacionadas con el mismo ancestro. También puede expresarse como la conservación o coherencia del contenido de genes y su orden en los cromosomas de diferentes genomas.

Virulencia: El grado de patogenicidad dentro de una especie. Es una medida cuantitativa de la patogenicidad y representa la severidad de la infección.

Resumen

El papel de la desacetilasa de histonas Hst1p en la Respuesta a Estrés Oxidante y Resistencia a Fluconazol en *Candida glabrata*.

En las últimas dos décadas, *Candida glabrata* ha emergido como un importante patógeno oportunista. Esta levadura, en respuesta a la limitación ambiental de niacina (precursor del cofactor NAD⁺), inactiva la desacetilasa de histonas Sir2p y favorece la colonización del hospedero mediante la inducción de adhesinas epiteliales. Se ha reportado que la sirtuina paróloga a Sir2p, Hst1p, participa en la restauración de los niveles de NAD⁺ bajo condiciones limitantes de niacina.

Sin embargo, este trabajo demuestra que Hst1p también actúa como un regulador negativo de la resistencia a fluconazol y la respuesta a estrés oxidante de *C. glabrata*. A pesar del alto grado de conservación de Hst1p entre *C. glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*, estas sirtuinas controlan un grupo de genes distinto en ambas especies. Identificamos que uno de los componentes que probablemente participa en esta regulación diferencial, es el represor Sum1p, ya que en ausencia de este factor, *C. glabrata* exhibe los mismos fenotipos que cuando carece de Hst1p. Datos de microarreglos respaldan nuestras observaciones y sugieren que la inducción de los genes regulados negativamente por Hst1p podría resultar favorable contra el estrés oxidante, durante la limitación de nutrientes y la exposición a fungistáticos. Hemos propuesto un modelo en donde la limitación de NAD⁺ o el estrés oxidante, inactivan temporalmente a Hst1p y otras sirtuinas, para inducir un estado protector celular. Consideramos probable que Hst1p y Sum1p formen un complejo represor importante en la patogenia de *C. glabrata*. Además, desarrollamos herramientas moleculares que nos permitirán marcar éstas proteínas con distintos epítomos y responder preguntas con respecto a los mecanismos que subyacen en dicha regulación.

PALABRAS CLAVE. *Candida glabrata*, fungistáticos azólicos, especies reactivas de oxígeno, sirtuinas, represor Sum1p, silenciamiento, NAD⁺.

Abstract

Role of the histone deacetylase Hst1p in the *Candida glabrata* oxidative stress response and fluconazol resistance.

In the last two decades *Candida glabrata* has emerged as an important agent in both mucosal and bloodstream infections. Sir2p is a NAD⁺-dependent histone deacetylase that represses several virulence-associated adhesins. It has been previously shown that these adhesins, are transcriptionally induced in response to environmental niacin limitation (NAD⁺ precursor) and that the Sir2p paralog, Hst1p, restores the intracellular NAD⁺ levels under this environmental cue.

Interestingly, this work shows that Hst1p is a negative regulator of the oxidative stress response and fluconazole resistance in *C. glabrata*. The Hst1p sequence is highly conserved among *C. glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. Surprisingly, these sirtuins regulate a different set of genes in both organisms. We identify the transcription factor Sum1p as a component of this differential regulation, because in its absence, *C. glabrata* becomes more resistant to hydrogen peroxide and fluconazole. Recent microarray data support our observations and suggest that genes negatively regulated by Hst1p, may be useful against oxidative stress, antifungal drugs and nutrient starvation. Here, we propose a model in which NAD⁺ limitation or oxidative stress, could induce a cellular protective state through the temporal inactivation of Hst1p and other sirtuins. Our results suggest that an interaction between Hst1p and Sum1p may exist and we believe that this putative complex could be important in the *C. glabrata* pathogenesis. Finally, we developed a set of plasmids for epitope tagging that will allow us to answer some questions about the underlying mechanism of Hst1p-Sum1p regulation of this responses.

KEYWORDS. *Candida glabrata*, azole antifungals, reactive oxygen species, sirtuins, Sum1p repressor, silencing, NAD⁺.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL PATÓGENO EMERGENTE *Candida glabrata*.

Las especies del género *Candida* son los patógenos fúngicos oportunistas más comunes en seres humanos y llegan a causar hasta el 8% de las infecciones sistémicas nosocomiales (Pfaller and Diekema, 2007). A pesar de los significativos avances hechos en la última década en el campo de la terapia antimicótica, éstas infecciones constituyen un importante problema de salud pública porque se asocian a altos y persistentes índices de mortalidad, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos (Trick *et al.*, 2002).

Candida glabrata es una levadura haploide, no dimórfica que normalmente se encuentra como comensal de la piel y mucosas de individuos sanos (Taschdjian *et al.*, 1970), sin embargo, bajo condiciones de atenuación inmunológica es capaz de causar candidiasis severas. En las últimas dos décadas, como consecuencia del uso indiscriminado de antimicóticos profilácticos como el fluconazol e inmunosupresores, *C. glabrata* ha emergido como el segundo agente causal de las candidemias. La figura 1 muestra que hasta el 22% de estas infecciones son causadas por *C. glabrata*, cifras que la ubican sólo después de *C. albicans* (Fidel *et al.*, 1999; Pfaller and Diekema, 2007). En México se ha reportado que el 12% de las vulvovaginitis (Buitron Garcia *et al.*, 2007) y el 8% de las candidemias (Gonzalez *et al.*, 2008) se deben a esta levadura.

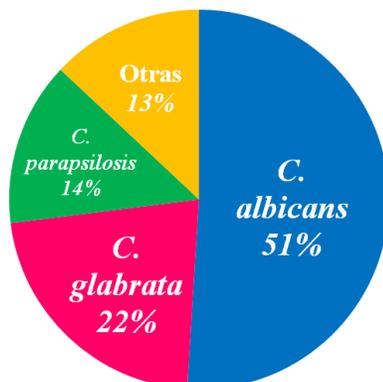


Figura 1. Distribución de las especies causantes de las candidemias en el periodo 2001-2004 en Norte América. Después de *C. albicans*, el patógeno fúngico más frecuentemente asociado a infecciones sistémicas fue *C. glabrata* (Pfaller and Diekema, 2007).

La relevancia de este suceso epidemiológico radica en el elevado índice de mortalidad asociado a las infecciones causadas por *C. glabrata* en comparación con otras especies no-*albicans* (Li *et al.*, 2007) y por su resistencia innata a los azoles (Bennett *et al.*, 2004; Berrouane *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2008; Manzano-Gayosso *et al.*, 2008; Miyazaki *et al.*, 1998; Vermitsky and Edlind, 2004). La importancia de estudiar a este patógeno emergente se refleja en el creciente número de publicaciones sobre *C. glabrata* a partir de la década de los ochenta, y en la secuenciación del genoma de la cepa *C. glabrata* CBS138 en 2004 por parte del proyecto *Genólevures* de genómica comparativa.

1.2 RELACIÓN FILOGENÉTICA ENTRE *C. glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Estudios epidemiológicos indican que *C. glabrata* y *C. albicans* causan infecciones sistémicas y de mucosas con manifestaciones clínicas muy semejantes (Fidel *et al.*, 1999). Sin embargo *C. glabrata* carece de factores de virulencia que han demostrado ser imprescindibles para el curso infectivo en *C. albicans*.

Entre estas diferencias, destaca la plasticidad fenotípica de *C. albicans* para sufrir un cambio morfológico de levadura a hifa verdadera, transición inexistente en *C. glabrata* bajo condiciones fisiológicas (Kaur *et al.*, 2005). Se conoce que después de ser fagocitada, *C. albicans* forma hifas para destruir a los leucocitos polimorfonucleares (LPMN). Esta conversión es importante para la supervivencia de *C. albicans* puesto que cepas mutantes no filamentosas son avirulentas (Lo *et al.*, 1997).

Además *C. albicans*, a diferencia de *C. glabrata*, es una levadura diploide. El árbol filogenético de la figura 2 ilustra la marcada diferencia genética entre ambas especies pero vincula estrechamente a *C. glabrata* con la levadura no patógena *Saccharomyces cerevisiae*. Se ha sugerido que *C. glabrata* y *C. albicans* presentaron una evolución independiente con el hospedero que no obstante, derivó en una virulencia similar (Kaur *et al.*, 2005).

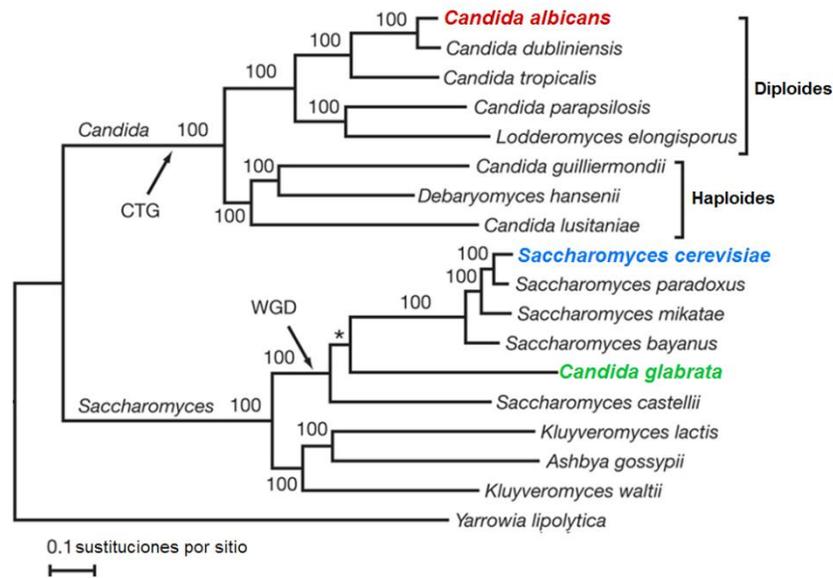


Figura 2. Árbol filogenético de las especies en los clados de *Candida* y de *Saccharomyces*. El análisis está basado en secuencias peptídicas de 706 genes de *S. cerevisiae* y los ortólogos de cada una de las 17 especies. A partir de los alineamientos peptídicos, la filogenia se infirió por un programa Bayesiano (*MrBayes*). La leyenda “CTG” hace referencia a que todas las especies del clado de *Candida* utilizan este codón para traducir serina en vez de leucina. También se indica el evento de la duplicación genómica ancestral (WGD) y la rama construida en base a la conservación sinténica (*). Tomada y modificada de (Butler *et al.*, 2009)

Se estima que hace 100 millones de años, ocurrió un evento de duplicación genómica en el ancestro común de *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, que explica la cercanía filogenética entre estas levaduras (Wolfe and Shields, 1997). Aún así *C. glabrata* conserva un menor número de bloques génicos duplicados que *S. cerevisiae* por lo que se ha sugerido que el patógeno oportunista es objeto de una evolución reductiva como resultado de su interacción con hospederos (Dujon *et al.*, 2004). También se ha propuesto que la virulencia de *C. glabrata*, podría deberse a los cientos de genes que no comparte con *S. cerevisiae* (Kaur *et al.*, 2005). Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que la patogénesis de *C. glabrata* también pueda explicarse por una regulación diferencial de los genes compartidos entre ambas levaduras.

1.3 FACTORES DE VIRULENCIA EN *C. glabrata*.

Pese a la creciente importancia epidemiológica de *C. glabrata* como patógeno emergente, pocos factores de virulencia han sido descritos para esta levadura. Hasta el momento se conocen los siguientes:

1.3.1 Adhesinas epiteliales: Se ha propuesto que la adherencia resulta de vital importancia para la colonización y la persistencia de las infecciones causadas por *C. albicans* (Calderone and Fonzi, 2001). En estudios de adherencia a células epiteliales humanas (HEp2) *in vitro*, se detectó que la adherencia de *C. glabrata* es mediada principalmente por la lectina Epa1p (proteína de pared celular anclada a glicosil-fosfatidilinositol) que reconoce glicoconjugados de *N*-acetil-lactosamina (Cormack *et al.*, 1999). Resulta interesante que *C. glabrata* posee más de 20 genes *EPA* dispersos en todo el genoma. Además, la mayoría se localiza en regiones subteloméricas sujetas a silenciamiento dependiente de la proteína Rap1p, del complejo proteico Sir (Sir2, 3p y 4p), de las proteínas Ku(70/80) y de Rif1p. (Castano *et al.*, 2005; De Las Penas *et al.*, 2003; Rosas-Hernandez *et al.*, 2008).

En *S. cerevisiae*, el silenciamiento transcripcional involucra el ensamble de la heterocromatina. La represión en los telómeros y regiones aledañas comienza con las proteínas Ku y Rap1, que reclutan a un complejo proteico conformado por Sir2, Sir3 y Sir4. Sir2p posee actividad catalítica de desacetilasa de histonas dependiente de NAD⁺, necesaria para la compactación de la cromatina (Brachmann *et al.*, 1995). A excepción de *EPA1*, el resto de los genes *EPA* subteloméricos se encuentran silenciados *in vitro*. Consistente con la hipótesis de que la expresión de los genes *EPA* es importante para la virulencia, las cepas mutantes *sir3Δ* son hiperadherentes y colonizan el riñón en mayor medida que la cepa silvestre en modelos murinos de infección sistémica; mientras que el grado de colonización cae dramáticamente cuando se mutan los genes *EPA1*, 6 y 7 (Castano *et al.*, 2005). Sobresale también la función de Epa6p en la formación de biopelículas en diversas superficies inorgánicas (Iraqi *et al.*, 2005).

Además, en modelos múridos de infección del tracto urinario, algunos *EPAs* subteloméricos (*EPA6* y *EPA7*) se inducen como consecuencia a la limitación en orina de ácido nicotínico (AN). *C. glabrata* es auxótrofa para el cofactor nicotín adenín dinucleótido (NAD^+) y el AN es un compuesto precursor que utiliza para sintetizar NAD^+ . Bajo esta condición, la desacetilasa Sir2p NAD^+ dependiente pierde su actividad y se desreprimen los genes subteloméricos. Se sugiere que en *C. glabrata* la adaptación al hospedero derivó en la incapacidad metabólica de sintetizar NAD^+ , y que esta auxotrofía se aprovecha como señal de activación para genes controlados por desacetilasas NAD^+ dependientes en algunos nichos del hospedero (Domergue *et al.*, 2005).

1.3.2 Secreción de hidrolasas: Para invadir los tejidos del hospedero, los microorganismo patógenos poseen enzimas hidrolíticas inducibles y constitutivas que destruyen o alteran los constituyentes celulares del organismo infectado, en particular las membranas. La producción de proteasas y fosfolipasas es otro de los atributos infectivos de varias especies de *Candida* (Calderone and Fonzi, 2001; Ghannoum, 2000)

En *C. albicans* las aspartil proteasas secretadas (SAP) son expresadas durante la infección e indispensables para la virulencia completa en infecciones sistémicas y de mucosas (De Bernardis *et al.*, 1999; Schaller *et al.*, 2000). *C. glabrata* contiene un gran número de genes que codifican para aspartil proteasas unidas a glicosil-fosfatidilinositol (GPI), denominadas yapsinas, que poseen ortólogos en *S. cerevisiae*. En *C. glabrata* este grupo de proteasas son necesarias para mantener la integridad de la pared celular, mediar la adherencia a células de mamífero y la supervivencia dentro de los macrófagos (Kaur *et al.*, 2007).

Las fosfolipasas son un grupo heterogéneo de enzimas que comparten la capacidad de hidrolizar el enlace fosfodiéster en glicerofosfolípidos. En *C. albicans* la fosfolipasa B (*PLB*) se secreta activamente durante la infección y está implicada en la diseminación del organismo en el tracto gastrointestinal y en el torrente sanguíneo (Ghannoum, 2000). *Candida glabrata* también posee actividad de fosfolipasa *in vitro* y su genoma codifica para tres genes *PLB*, ortólogos a *S. cerevisiae* (Kaur *et al.*, 2005). No obstante, hasta el momento no se ha descrito la

relevancia de esta actividad en la virulencia y se ha reportado que cepas provenientes de aislados clínicos carecen de dicha actividad (Pinto *et al.*, 2008).

1.3.3 Reguladores transcripcionales: En *S. cerevisiae* los factores transcripcionales Ace2p y Swi5p con 38% de identidad proteica, regulan la expresión de varios genes durante la fase tardía M₁ y el comienzo de la fase G₁ del ciclo celular. Los genes blancos de Ace2p se expresan predominantemente en las células hijas e incluyen la quitinasa (*CTS1*) y otras proteínas requeridas para su separación de la célula progenitora. En esta levadura, la ausencia del gen *ACE2* conlleva a la formación de pseudohifas, invasión del agar y crecimiento grumoso en medio líquido, mientras que mutantes nulas en *SWI5* son incapaces de intercambiar su tipo de apareamiento (MacCallum *et al.*, 2006).

Estas dos proteínas están conservadas en *C. glabrata*. Las mutantes *swi5Δ* incrementan el grado de colonización en cerebro y pulmón en modelos murinos de infección sistémica (MacCallum *et al.*, 2006). Se conoce que la ausencia de *ACE2* resulta en la alteración de la cantidad de más de 60 proteínas (Stead *et al.*, 2005) y en la hipervirulencia de la cepa mutante, pero sólo en ratones neutropénicos (Kamran *et al.*, 2004; MacCallum *et al.*, 2006), observación que confirma la importancia del estado inmunológico del hospedero para el establecimiento de la infección.

Para *C. glabrata* se han caracterizado algunos de los componentes de la cascada de señalización de cinasas de proteínas activadas por mitógeno (MAPK), que en *S. cerevisiae* regulan la formación de pseudohifas. Entre los componentes de esta vía, la cinasa Ste11p y el factor transcripcional Ste12p altamente conservado entre los hemiascomicetos, son necesarios para la formación de pseudohifas en condiciones limitantes de nitrógeno y para la virulencia normal de *C. glabrata* (Calcagno *et al.*, 2003; Calcagno *et al.*, 2005).

1.4 *Candida glabrata* DESARROLLA RESISTENCIA A LOS AZOLES

En la década de los noventa se introdujo el fluconazol, un agente antifúngico triazólico mucho menos tóxico que la anfotericina B, que por su excelente biodisponibilidad y actividad de amplio espectro se utilizó para el tratamiento de diversas micosis, entre ellas las candidiasis (Pasko *et al.*, 1990). El mecanismo de acción de los azoles es a través de la inhibición de la síntesis de ergosterol, componente lipídico de las células fúngicas que por estar ausente en células animales, brinda especificidad a éstos fármacos fungistáticos. Los azoles inactivan a la enzima P-450 lanosterol 14- α desmetilasa codificada por el gen *ERG11* y conllevan a la inhibición del crecimiento fúngico por la acumulación de esteroides metilados (Parkinson *et al.*, 1995).

Sin embargo, *C. glabrata* posee una resistencia innata a los azoles que explica en parte su prevalencia clínica (Gonzalez *et al.*, 2008; Manzano-Gayosso *et al.*, 2008; Pfaller and Diekema, 2007). En la figura 3 se esquematizan algunos de los mecanismos descritos que generan resistencia a fluconazol, entre los que se encuentran: (1) cambios en la pared celular o membrana plasmática que conllevan a la incapacidad de introducir azoles; (2) alteraciones genéticas que disminuyan la afinidad de la enzima blanco (Erg11p) por el fármaco; (3) sobreexpresión del gen *ERG11* (Vermitsky and Edlind, 2004); y principalmente por (4) la salida del xenobiótico mediado por los transportadores de casete de unión a ATP (ABC) o de la superfamilia facilitadora principal (MFS) (Bennett *et al.*, 2004; Miyazaki *et al.*, 1998; Parkinson *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 2001; Vermitsky and Edlind, 2004).

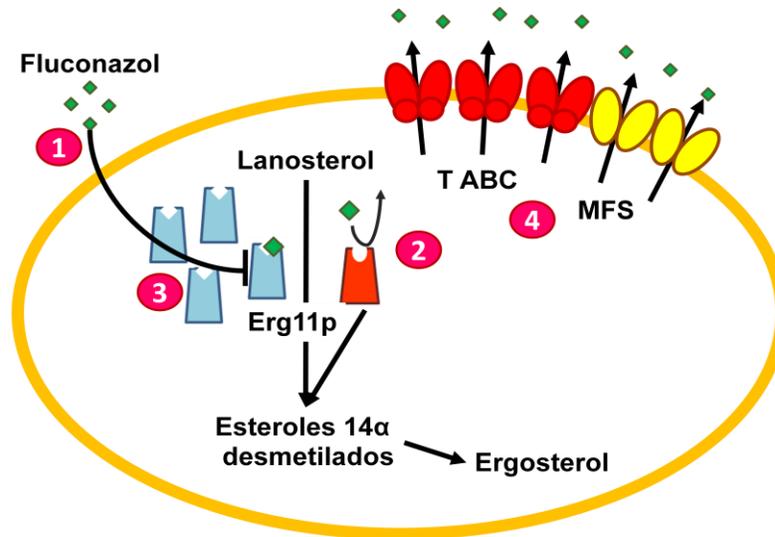


Figura 3. Algunos mecanismos que confieren resistencia a azoles en *C. glabrata*. El fluconazol penetra las células fúngicas e inhibe la síntesis de ergosterol al unirse a la enzima Erg11p. Para inhibir la acción fungistática del fármaco 1) se modifica la pared o membrana celular para evitar su ingreso; 2) se altera la afinidad de la enzima Erg11p por el fluconazol; 3) se sobreexpresa *ERG11* y 4) se expulsa el antifúngico por medio de transportadores ABC o MFS.

Tanto en la cepa CBS138 y en diferentes aislados clínicos de *C. glabrata*, la sobreexpresión de transportadores ABC, principalmente *CDR1*, *PDH1* (*CDR2*) y *SNQ2*, es determinante en la resistencia a azoles (Bennett *et al.*, 2004; Miyazaki *et al.*, 1998; Parkinson *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 2001; Sanguinetti *et al.*, 2005; Torelli *et al.*, 2008). La expresión constitutiva e inducible de los genes *CDR* es regulada por el factor transcripcional Pdr1p, que reconoce secuencias del elemento de respuesta a fármacos pleiotrópicos (PDRE), en los promotores de estos genes (Tsai *et al.*, 2006). Se ha reportado que el mecanismo de resistencia a multifármacos implica la unión estructural de Pdr1p al xenobiótico (de naturaleza muy diversa) y que la subunidad Gal11p del complejo Mediador de la transcripción es esencial para inducir a los genes *CDR* (Thakur *et al.*, 2008).

Se ha observado que en aislados clínicos ocurren frecuentemente mutaciones de ganancia de función en *PDR1* cuya consecuencia es el incremento en la expresión de los transportadores ABC y en la virulencia de las cepas (Ferrari *et al.*, 2009). Además, algunos aislados clínicos resistentes a fluconazol presentan rearrreglos cromosómicos que aumentan la dosis génica de algunos genes de transportadores ABC (Polakova *et al.*, 2009).

1.5 RESPUESTA DEL HOSPEDERO CONTRA *Candida glabrata*.

La capacidad de los patógenos fúngicos para causar enfermedad requiere de mecanismos de evasión del sistema inmune. Observaciones clínicas y estudios experimentales indican que la respuesta inmune innata mediada por leucocitos polimorfonucleares (PMN) es el principal mecanismo para controlar las candidiasis. (Lyman and Walsh, 1994; Nessa *et al.*, 1997).

Los fagocitos engullen a los agentes infecciosos para eliminarlos y controlar su diseminación. En respuesta a la fagocitosis y a citocinas pro-inflamatorias, las células PMN desatan la producción de altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el fagosoma (Babior, 1982). El evento, denominado estallido respiratorio, se caracteriza por un incremento en el consumo de oxígeno y por el ensamble membranal de la oxidasa fagocítica dependiente de NADH (Nox2p). El acople de las subunidades que conforman a este complejo multimérico (gp91^{phox}, p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y Rac2p), se encuentra finamente regulado (Quinn and Gauss, 2004). En neutrófilos en reposo, Nox2p se localiza predominantemente (90%) en vesículas secretorias y gránulos específicos. Después de la captura del microorganismo, las membranas de estas vesículas se funden al fagosoma y Nox2p se activa. Mediante la reducción parcial del oxígeno molecular, la oxidasa genera radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que son secretados hacia el interior del fagosoma donde alcanzan una concentración de 100 μ M y desencadenan daño oxidante al agente infeccioso (Korshunov and Imlay, 2002; Missall *et al.*, 2004; Werner, 2004). La actividad de cualquiera de los componentes de Nox2p es vital para la inmunocompetencia. Los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica son propensos a sufrir infecciones fúngicas y bacterianas recurrentes porque poseen alelos mutantes de los genes de las subunidades de Nox2p y por lo tanto sus fagocitos no son funcionales (Goldblatt and Thrasher, 2000).

Existe evidencia de que los sistemas antioxidantes de organismos patógenos fungen como determinantes de virulencia al prevenir o interferir en el estallido respiratorio en el fagosoma. Reportes indican que *C. albicans* y *C. glabrata* reprimen activamente la producción de ERO por el fagocito (Wellington *et*

al., 2009) y que existe un aumento en la transcripción de la catalasa (CTA1) cuando *C. glabrata* es fagocitada por los macrófagos J774A.1 (Kaur *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que la catalasa de *C. glabrata* permite la adaptación a niveles elevados de ERO *in vitro*, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. Sin embargo, la catalasa resulta prescindible para la virulencia y la adaptación a dosis bajas de estrés oxidante. Esta evidencia sugiere que existen otros mecanismos que compensan la ausencia de esta enzima para sobrevivir a las ERO del fagosoma, posiblemente peroxidasas (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008).

1.6 EL METABOLISMO AEROBIO Y LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

La producción del oxígeno a través de la fotosíntesis es el proceso dominante global que abastece a los océanos y a la atmósfera del combustible que sostiene la vida aeróbica. Los registros geoquímicos de óxidos terrestres sugieren que la aparición del O₂ se produjo en los precursores de cianobacterias hace 2,8 miles de millones de años (Dismukes *et al.*, 2001). La creación de sistemas fotosintéticos capaces de degradar el agua en O₂, protones (H⁺) y electrones (e⁻) fue un acontecimiento clave para la evolución de la vida en la tierra, pues oxigenó gradualmente la atmósfera primitiva. Bajo esta circunstancia se favoreció la selección de organismos aerobios que utilizaban al O₂ como aceptor final de electrones para el metabolismo. Este sistema de generación de energía es altamente eficiente, produce 18 veces más ATP que la contraparte anaerobia y su aparición se relaciona con la evolución de organismos eucariotas, complejos y pluricelulares (Falkowski *et al.*, 2005).

La principal desventaja del metabolismo aerobio es la fuga espontánea de e⁻ a partir de la cadena del sistema de transporte de electrones mitocondrial, porque da lugar a ERO potencialmente dañinas (Cadenas and Davies, 2000). Bajo condiciones fisiológicas la mitocondria es la principal fuente intracelular de ERO (~90%) y se estima que un 0,1-0,5% del O₂ consumido es transformado a radicales oxigenados (Balaban *et al.*, 2005; Giorgio *et al.*, 2007). Los principales oxidantes que se forman por la reducción parcial del O₂ incluyen al anión

superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al altamente nocivo radical hidroxilo (OH^{\bullet}).

El radical OH^{\bullet} entrecruza, fragmenta y oxida residuos proteicos del tipo aromático y/o azufrado, o bien grupos prostéticos. Los ácidos grasos insaturados, son también blanco del radical OH^{\bullet} y disparan la peroxidación lipídica autocatalítica con efectos nocivos para la membrana celular. El daño al DNA causado por OH^{\bullet} , implica recombinación intra e intercromosómica que deriva en cambios mutagénicos perjudiciales (Ragu *et al.*, 2007; Temple *et al.*, 2005).

1.7 LAS ERO COMO MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN.

Los efectos dañinos de las ERO están bien documentados (Scandalios, 2005; Temple *et al.*, 2005), pero en años recientes se ha propuesto que las ERO pueden ser reguladores importantes en la transducción de señales (D'Autreaux and Toledano, 2007; Finkel, 2003; Giorgio *et al.*, 2007; Hampton *et al.*, 1998; Madeo *et al.*, 1999; Rhee, 2006; Scandalios, 2005; Veal *et al.*, 2007; Vivancos *et al.*, 2006). Por sus propiedades químicas, cada ERO reacciona con blancos biológicos preferidos. En la tabla 1 se encuentran las características de reactividad, estabilidad y concentración intracelular de las principales ERO, mientras que la figura 4 muestra las reacciones que originan ERO y sus principales blancos. Como regla general, mientras mayor sea la reactividad de la ERO, es mayor la toxicidad y menor la capacidad de señalización que la molécula posea.

Tabla 1. Características bioquímicas de las ERO				
	ERO			
	$O_2 \rightarrow O_2^{\bullet-}$	$\rightarrow H_2O_2$	$\rightarrow OH^{\bullet}$	$\rightarrow H_2O$
Potencial de reducción (V)	0,94	0,32	2,31	
Vida media (s)	10^{-6}	10^{-5}	10^{-9}	
Concentración <i>in vivo</i> (M)	10^{-10}	10^{-8}-10^{-4}	10^{-15}	

V: voltios, s: segundos y M: concentración molar (mol/L)

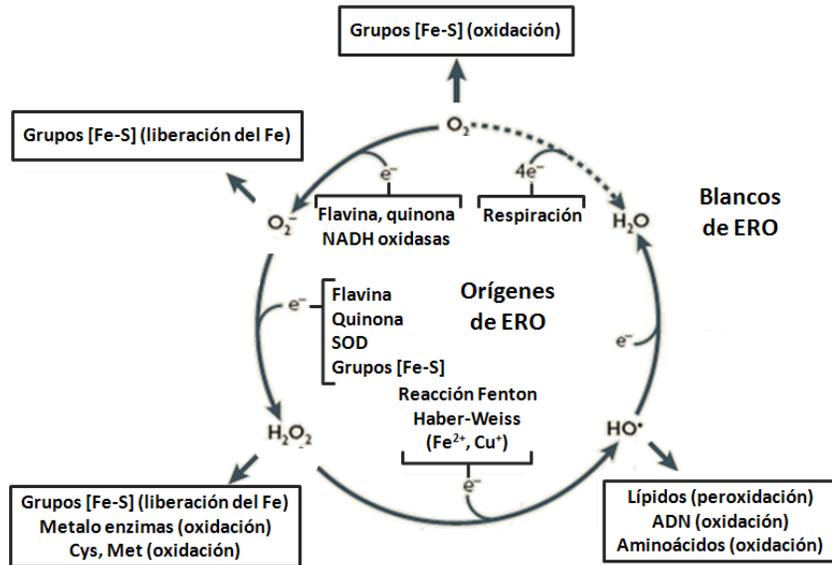


Figura 4. Los orígenes y blancos celulares de las principales ERO. La reducción completa del oxígeno a agua requiere de la transferencia final de cuatro electrones. En varios puntos de la cadena de citocromos, la fuga de electrones reduce parcialmente al oxígeno y genera $O_2^{\bullet-}$, con gran afinidad por grupos ferrosulfurados $[Fe-S]$. La dismutación espontánea o catalítica del $O_2^{\bullet-}$ da lugar a H_2O_2 . Este radical oxida grupos $[Fe-S]$, metaloenzimas y aminoácidos azufrados. En presencia de metales de transición, el peróxido se reduce y se obtiene el radical HO^{\bullet} , responsable de los efectos deletéreos en la célula. (Tomado y modificado de D'Autreaux and Toledano, 2007)

Como producto alterno de la respiración el superóxido es generado principalmente en la mitocondria por el citocromo *bcl* (complejo III) y la NADH ubiquinona oxireductasa (complejo I), así como por otras NADH oxidasas (figura 4). *Saccharomyces cerevisiae* carece del complejo I, pero posee tres NADH deshidrogenasas; una en la matriz mitocondrial (Ndi1p) y dos en el espacio intermembranal (Nde1p y Nde2p) que también reducen parcialmente el oxígeno (Herrero *et al.*, 2008). Debido a su gran afinidad, el $O_2^{\bullet-}$ oxida grupos ferrosulfurados $[Fe-S]$ a un índice limitado solamente por la difusión del compuesto con la consecuente liberación del hierro y la inactivación de la enzima. Por su inestabilidad e incapacidad para difundir libremente entre membranas, el $O_2^{\bullet-}$ carece de potencial como molécula de señalización celular (tabla 1) (D'Autreaux and Toledano, 2007).

La dismutación espontánea o enzimática del $O_2^{\bullet-}$ produce peróxido de hidrógeno (figura 4). El H_2O_2 es en realidad un oxidante débil que reacciona moderadamente con centros ferrosulfurados y muy lentamente con glutatión

(GSH), cisteínas y metioninas libres. Sin embargo, su reactividad hacia residuos de cisteína puede ser significativamente incrementada dependiendo del contexto proteico que englobe al residuo. Además el H_2O_2 es relativamente estable y su difusión puede ser modulada por cambios en la permeabilidad de las membranas o a través del transporte mediado por acuaporinas, características que convierten al peróxido como un buen candidato de señalización, ver tabla 1 (D'Autreaux and Toledano, 2007).

Recientemente se enfatizó la importancia del H_2O_2 en la regulación fisiológica de importantes eventos en organismos uni y pluricelulares, tales como la proliferación y diferenciación celular, migración, apoptosis y senescencia (Finkel, 2003; Veal *et al.*, 2003). Además resulta interesante que los niveles intracelulares de esta ERO están marcadamente conservados en diferentes formas de vida y que varias enzimas se encargan de producir y otras de degradar H_2O_2 . De este modo, tal parece que el H_2O_2 regula respuestas tan divergentes, al modular sutilmente los niveles y el tiempo de duración del impulso oxidante en el contexto celular que acompañe al cambio oxidoreductor (Giorgio *et al.*, 2007).

El H_2O_2 se reduce completamente a agua por la catalasa y varias peroxidases (glutaredoxinas y peroxiredoxinas), pero su efecto tóxico proviene de la potencialidad de reducirse al OH^\bullet por la reacción de Fenton acoplada a la reacción Haber-Weiss en presencia de metales de transición (ver figura 4). En cambio, por su elevada e indiscriminada reactividad, el radical OH^\bullet es altamente tóxico. Su baja vida media (tabla 1) e inestabilidad lo confina prácticamente sólo al sitio donde se genera, por lo que es probable que carezca de un papel de señalización.

A pesar de que la función de las ERO como parte de diversas vías de señalización ha sido documentada y estudiada, esta afirmación es aún controversial. El escepticismo nace de la paradoja entre la especificidad requerida para la señalización y la naturaleza reactiva de las ERO como oxidantes indiscriminados y potencialmente letales. Una ERO opera mediante reacciones químicas con átomos específicos de proteínas blanco que llevan a modificaciones covalentes proteicas. Dado que el reconocimiento de una ERO por ligando ocurre

a nivel atómico, el número potencial de sustratos se eleva exorbitantemente. A pesar de ello, existen sistemas proteicos específicos de sustrato (D'Autreaux and Toledano, 2007; Okazaki *et al.*, 2007; Veal *et al.*, 2007; Vivancos *et al.*, 2006). Algunas de estas vías están involucradas en la respuesta a estrés oxidante (REO) y utilizan compuestos proteicos como detectores de los niveles de ERO. Los detectores miden la concentración intracelular de radicales oxidantes a través de reacciones de oxidación/reducción e inducen la expresión de depuradores específicos para mantener el nivel de ERO por debajo del umbral tóxico (D'Autreaux and Toledano, 2007; Veal *et al.*, 2007).

1.8 RESPUESTA A ESTRÉS OXIDANTE.

Las ERO son productos alternos normales del metabolismo aerobio. Para contrarrestar sus efectos deletéreos y preservar el balance oxidoreductor, la célula aerobia desarrolló respuestas antioxidantes basales e inducibles a lo largo de su evolución. Estas defensas altamente conservadas en los organismos aerobios, incluyen la síntesis de compuestos antioxidantes como: GSH, ubiquinol, ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides y tocoferoles (vitamina E); así como enzimas depuradoras de ERO como: superóxido dismutasas, catalasas, peroxidasas, glutaredoxinas y tioredoxinas (Scandalios, 2005).

Algunos estímulos ambientales como la radiación ultravioleta, las elevadas intensidades luminosas, las temperaturas extremas, las toxinas, los metales y unos cuantos xenobióticos conllevan a estrés oxidante. Esta condición se caracteriza por un cambio oxidoreductor abrupto debido a la acumulación excesiva de ERO, la disminución de antioxidantes o ambas. Bajo esta situación, algunas proteínas clave son oxidadas y se activan vías de señalización para que la célula modifique su patrón transcripcional e induzca genes que contrarresten este estrés (Drakulic *et al.*, 2005).

Al igual que otros organismos aerobios, las levaduras responden a ERO en función de su concentración. En *S. cerevisiae*, más de 500 genes se inducen bajo tratamiento moderado con H₂O₂ (He and Fassler, 2005). Esta amplia y rápida respuesta genómica enfatiza la importancia de la regulación transcripcional en la

adaptación a estrés oxidante. Bajo estas circunstancias, se activa un programa de expresión génica antioxidante controlado principalmente por los factores transcripcionales Yap1p, Skn7p y Msn2/4p, y se induce retraso o arresto del ciclo celular en G₂, dependiente del factor Rad9p (Flattery-O'Brien and Dawes, 1998). Esta respuesta permite depurar el exceso de ERO, reemplazar componentes dañados y adaptarse a concentraciones mayores de ERO que en otras circunstancias resultarían letales (Perrone *et al.*, 2008).

Yap1p es miembro de la familia proteica c-jun y contiene una cremallera básica de leucina como dominio de unión a ADN en el extremo N-terminal. Yap1p se identificó como el homólogo funcional de *AP-1* (proteína activadora 1, del inglés *Activator Protein-1*) de mamíferos con base en su capacidad de unirse al elemento de respuesta a *AP-1* (ARE del inglés *AP-1 Response Element*; TGAATAA). Más tarde se demostró que Yap1p tiene preferencia por el elemento YRE (del inglés *Yap1p Response Element*; TTAGTAA) y sus variantes TTAGTMAGC y TTAGTMA [M puede ser A o C, y S, G o C]. Al igual que otras proteínas de respuesta a estrés oxidante, las reacciones de intercambio tiol-disulfuro son críticas para la regulación de Yap1. Bajo condiciones fisiológicas, Yap1p se localiza principalmente en el citoplasma porque el exporte nuclear constitutivo predomina sobre el transporte hacia el interior del núcleo. Bajo estrés oxidante, la glutatión peroxidasa 3 (Gpx3p también conocida como Orp1) detecta peróxido de hidrógeno mediante la oxidación a ácido sulfénico de la cisteína de su sitio catalítico. Posteriormente este residuo oxidado reacciona con varios tioles del dominio rico en cisteínas del extremo C-terminal de Yap1p y cambia su conformación. Esta alteración estructural captura la señal de exportación nuclear de tal modo que la proteína no puede ser reconocida por el receptor de exporte nuclear (Crm1) y se acumula en núcleo, donde activa sus genes blanco (Okazaki *et al.*, 2007).

Skn7p es un regulador de respuesta que contiene un receptor típico de los sistemas de transducción de señales de dos componentes y un dominio de unión a ADN parecido al del factor de choque térmico Hsf1p. Skn7p induce la transcripción de genes antioxidantes mediante el reconocimiento del elemento de respuesta a estrés oxidante OSRE (del inglés, *Oxidative Stress Response*

Element; GNCNNGSCS) [N, puede ser cualquier base y S, G o C] (He and Fassler, 2005).

Por último, el factor transcripcional Msn2p y su parálogo Msn4p, son activadas por diferentes condiciones de estrés, entre ellas el daño oxidante (Schmitt and McEntee, 1996). Además, se ha documentado que estos factores participan en el envejecimiento de levaduras (Fabrizio *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2008). Estas proteínas, al igual que Yap1p, responden a señales que las retienen y expulsan del núcleo, pero el domino de unión a ADN está formado por un dedo de zinc C₂H₂ en el C-terminal que reconoce al elemento de respuesta a estrés STRE (del inglés *STress Response Element*; AAGGGG o MAGGGGSGG) [M puede ser A o C, y S, G o C]. (Roetzer *et al.*, 2008)

Algunos microorganismos patógenos responden rápidamente al estrés oxidante y reprograman su patrón de expresión génica para amortiguar el efecto letal del estallido respiratorio. Un reporte reciente señala que *C. glabrata* es altamente resistente a H₂O₂ *in vitro*, sobre todo en fase estacionaria. Esta elevada resistencia está concertada por los factores transcripcionales Skn7p, Msn2/4p y Yap1p, mientras que la resistencia adaptativa en crecimiento exponencial es dependiente de Yap1p, Skn7p y Msn4p, y en menor medida por Msn2p (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008). Es posible que esta eficiente e innata REO de *C. glabrata*, juegue un papel importante en la supervivencia durante la infección, por lo que resulta fundamental conocer a los reguladores y efectores involucrados en los mecanismos de adaptación a estas elevadas dosis de ERO.

1.9 ENVEJECIMIENTO, ESTRÉS OXIDANTE Y SIRTUINAS.

La hipótesis de los radicales libres o el estrés oxidante es la teoría más aceptada del envejecimiento. A mediados de la década de los cincuenta, Denham Harman argumentó que el envejecimiento era reflejo de la acumulación de daño celular por la producción endógena de ERO (Harman, 1956). La teoría es apoyada por un vasto cuerpo de evidencia experimental: 1) los organismos aerobios generan crónicamente poderosas especies pro-oxidantes (ERO); 2) las células acumulan daño oxidante a través del tiempo; 3) Las ERO inducen senescencia celular y

apoptosis (Madeo *et al.*, 1999); y 4) ERO, senescencia y apoptosis están mecánicamente vinculadas a enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento. Entonces el envejecimiento se considera como la expresión de un programa genético que genera H_2O_2 como molécula de señalización (Giorgio *et al.*, 2007).

En *S. cerevisiae* se han estudiado dos modelos de envejecimiento: la senescencia replicativa, para las células mitóticamente activas y, el envejecimiento cronológico, émulo de células en estado posmitótico. En la figura 5 se muestra un esquema representativo de los dos modelos.

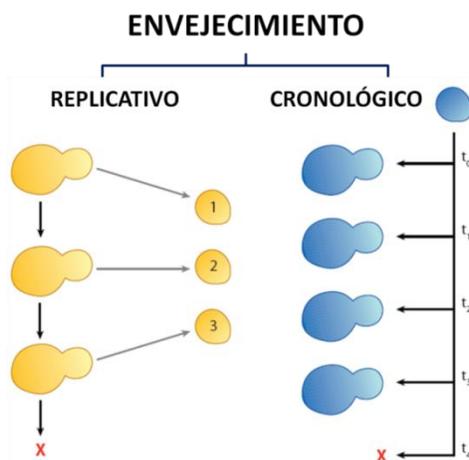


Figura 5: Envejecimiento replicativo y cronológico en levadura. El modelo del envejecimiento replicativo estudia los mecanismos que definen el número de divisiones mitóticas que una célula madre experimenta antes de morir y los cambios que se producen en el transcurso. La edad replicativa de la levadura puede ser determinada por el número de cicatrices de gemación en su superficie. El modelo del envejecimiento cronológico tiene como objeto de estudio los cambios moleculares y fisiológicos que experimenta la célula posmitótica por el tiempo que permanece viable y definir las razones que le permiten reanudar o no el ciclo celular. Tomado y modificado de Steinkraus *et al.*, 2008.

El crecimiento vegetativo en *S. cerevisiae* ocurre por gemación. Este mecanismo mitótico asimétrico, ocasiona que después de la citocinesis, la célula madre resulte de mayor tamaño que la hija. Tras cada gemación, se produce una cicatriz de quitina en la superficie de la célula progenitora, por lo que su número se correlaciona directamente con las veces que ha experimentado mitosis. Para *S. cerevisiae* se ha calculado que la vida media comprende 25 generaciones (Rockenfeller and Madeo, 2008).

En la década de los ochenta se determinó que el número de ciclos replicativos, y no la cantidad de tiempo después de la gemación, era el determinante principal del ciclo vital en levadura (Muller *et al.*, 1980). Éstas observaciones fueron apoyadas por el hecho de que las células que alcanzan un estado posmitótico no se lisan inmediatamente. Sin embargo, aún cuando la lisis puede ser el resultado final de estas células, muchas de ellas permanecen metabólicamente activas varios días. Es entonces que el tiempo que una célula posreplicativa permanece viable ha sido determinado y se ha utilizado para estudiar el envejecimiento cronológico (Steinkraus *et al.*, 2008).

Es interesante resaltar que los dos modelos de envejecimiento comparten como característica la acumulación de ERO a medida que incrementa la edad cronológica o replicativa de la célula (Balaban *et al.*, 2005). Al parecer, la razón reside en el deterioro que sufre la mitocondria a través del tiempo como consecuencia de la proximidad que tiene con las fuentes de oxidantes (Balaban *et al.*, 2005). Además, se ha reportado que las células senescentes exhiben marcadores apoptóticos, tales como la externalización de fosfatidilserina en la membrana celular, la fragmentación del ADN y la acumulación de proteínas carboniladas, por lo que resulta evidente que estas células mueren finalmente por apoptosis (Rockenfeller and Madeo, 2008).

En la figura 6A se presentan las observaciones hechas a partir del modelo de envejecimiento replicativo. Gracias a que *S. cerevisiae* se divide asimétricamente, la edad replicativa no se hereda a la progenie. Bajo este mecanismo de división, los componentes celulares frescos, recién sintetizados se transmiten preferencialmente a las células hijas, mientras que la célula madre retiene la mayor parte de los factores del envejecimiento (ERO, biomoléculas oxidadas y círculos extracromosómicos de ADN ribosomal). Se ha documentado que a medida que la célula madre envejece, pierde la capacidad de retención de componentes celulares dañados y por lo tanto termina heredándolos a la progenie, acortando el ciclo de vida replicativo de la célula hija (figura 6B) (Steinkraus *et al.*, 2008).

En *S. cerevisiae* se ha demostrado que la herencia asimétrica de las proteínas oxidadas y de los círculos extracromosómicos de ADN ribosomal (ERCs; del inglés *Extrachromosomal RDNA Circles*) es dependiente del regulador de información silenciosa Sir2p (Figura 6C)(Aguilaniu *et al.*, 2003). Sir2p es el miembro fundador de la familia de las sirtuinas. Estas desacetilasas de histonas dependientes de NAD⁺ están ampliamente conservadas y son capaces de compactar la estructura de la cromatina para regular la expresión génica. Al utilizar NAD⁺ como cofactor, las sirtuinas relacionan el estado transcripcional de la célula con el metabólico. En *S. cerevisiae*, el complejo Sir (Sir2, 3p y 4p) es requerido para establecer el silenciamiento en regiones subtelméricas y en los dos *loci* homólogos al *locus* de apareamiento (HM, del inglés *Homologous to MAT*). Además, la región de ADN ribosomal, que consiste de 100 a 150 copias en tándem codificante para el componente nucleotídico de los ribosomas, también es silenciada por Sir2p. En esta región, la pérdida del silenciamiento conlleva a la formación de ERCs por recombinación homóloga, directamente asociados al envejecimiento en levadura (Steinkraus *et al.*, 2008).

Otro reporte indica que las células hijas experimentan un proceso de reducción en los niveles de ERO inmediatamente después de la citocinesis. El descenso en los niveles de H₂O₂ en las células hijas resulta de la segregación preferencial de la catalasa citosólica (Ctt1p) mediante un mecanismo aún no definido que depende del citoesqueleto de actina y Sir2p. El resultado es que la progenie se encuentra preparada para combatir el estrés oxidante y retrasar sus efectos deletéreos (Erjavec and Nystrom, 2007).

En la figura 6C se esquematiza que las cepas mutantes nulas para *SIR2* envejecen prematuramente porque tanto células madres como hijas acumulan altos niveles de ERCs y proteínas carboniladas, tal y como lo hace una célula senil. En caso contrario, la adición de una copia de esta sirtuina incrementa la longevidad replicativa en un 40% (Fabrizio *et al.*, 2005). Estas evidencias sugieren que Sir2p inhibe el envejecimiento replicativo mediante su actividad desacetilasa. Sin embargo, el efecto inverso para Sir2p se ha propuesto en modelos de

envejecimiento cronológico, en los que la sirtuina tiene un papel pro-envejecimiento.

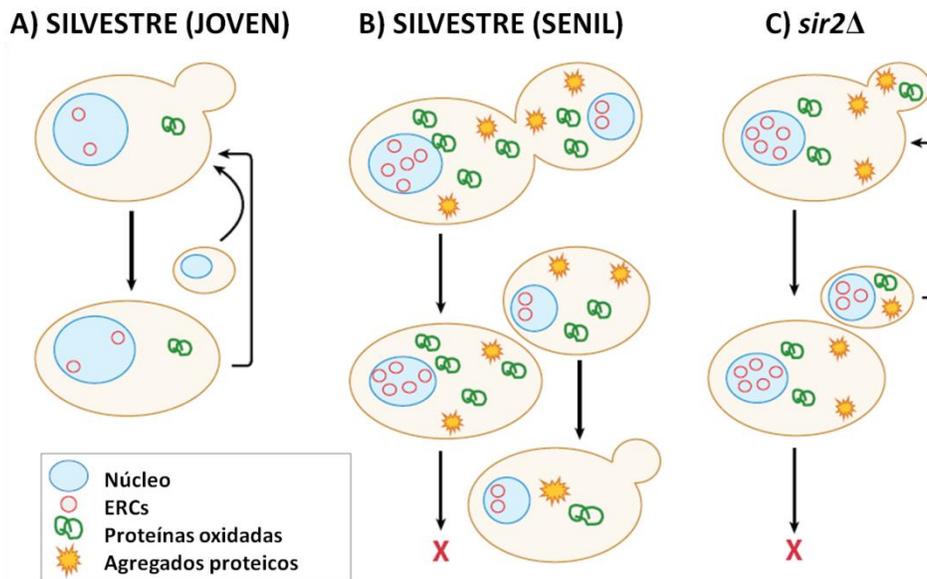


Figura 6. La asimetría de la división se pierde en células madre seniles y en ausencia de Sir2p. En la esquina inferior izquierda se representa el núcleo y los tres principales marcadores de envejecimiento replicativo: ERCs, proteínas oxidadas y agregados proteicos. A) En las células silvestres jóvenes, los niveles de ERCs y proteínas oxidadas son bajos y tras la citocinesis son secuestrados en la célula madre. B) Cuando las células envejecen, los tres factores se acumulan en gran cantidad en la célula madre e inevitablemente la progenie hereda una parte. Como resultado se tiene una célula hija con menor potencial replicativo. C) En ausencia de Sir2p las células acumulan niveles anormalmente altos de ERCs, proteínas oxidadas y agregados, y se pierde la asimetría mitótica, por lo que ambas células acortan su ciclo replicativo. Tomado y modificado de Steinkraus *et al.*, 2008.

La restricción calórica es una condición limitante de nutrientes que extiende el ciclo de vida de todos los organismos en los que se estudia el envejecimiento, sin embargo aún se desconocen los mecanismos que la regulan (Steinkraus *et al.*, 2008). Cuando están sometidas a restricción calórica, la pérdida de Sir2p incrementa la longevidad de células posmitóticas pero no de las replicativas (Fabrizio *et al.*, 2005; Longo and Kennedy, 2006). Resulta interesante que las células posmitóticas mutantes en *SIR2*, incrementan su resistencia a estrés oxidante y choque térmico. Además también se incrementan los niveles de la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh2p), necesaria para la utilización del etanol como fuente de carbono. En presencia de glucosa, las células mitóticamente activas generan energía a través de la fermentación, lo que lleva a la acumulación

de etanol. A medida que la glucosa se agota y el etanol aumenta, las levaduras experimentan un cambio metabólico (cambio diáuxico) que les permite ahora oxidar al etanol y emplearlo como fuente de carbono. Se ha especulado que en ausencia de Sir2p, una mayor actividad de la Adh2p en células posmitóticas, lleva a una degradación acelerada del etanol y a una entrada temprana al estado estacionario, más estable y resistente a estrés, donde también se inducen los factores transcripcionales Msn2/4p (Fabrizio *et al.*, 2005).

En *S. cerevisiae*, se conocen tres vías de cinasas conservadas que parecen jugar un papel compartido en el envejecimiento cronológico y replicativo. Las vías de señalización Ras/AC/PKA, Sch9p y TOR integran señales ambientales con respecto a la disponibilidad de nutrientes y regulan el crecimiento y la división celular. La subregulación por restricción calórica o mutaciones que resultan en un descenso de la actividad de Ras/AC/PKA, Sch9p o TOR, incrementan la longevidad replicativa y cronológica, a la par que protegen contra choque térmico y estrés oxidante. Recientemente se describió que la cinasa Rim15p es un integrador clave en el que convergen las señales desencadenadas por Ras/AC/PKA, Sch9p y TOR. En restricción calórica, Rim15p induce la expresión de genes involucrados en la entrada a fase G_0 y de genes de respuesta a estrés mediante los factores transcripcionales Msn2/4p y Gis1p. Este último, es un factor clave en células que entran a fase estacionaria y reconoce el elemento de cambio posdiáuxico (PDS, del inglés *PostDiauxic Shift*; AWAGGGAT) (Wei *et al.*, 2008).

En la figura 7 se presenta el mecanismo de regulación propuesto por Fabrizio y cols (2005) para la extensión del ciclo vital cronológico durante la restricción calórica. Además se incluye la posible participación de Sir2p como regulador negativo de Adh2p, Msn2/4p y Gis1p con base en las observaciones hechas por este mismo grupo (Fabrizio *et al.*, 2005).

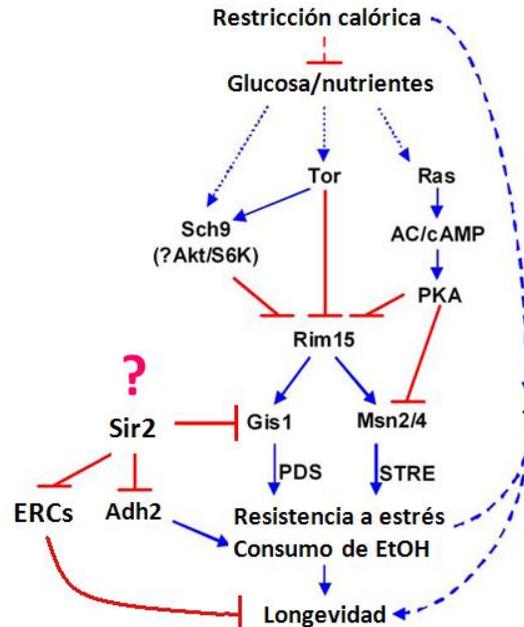


Figura 7. Vías regulatorias de longevidad en *S. cerevisiae* y el papel dual de Sir2p. Bajo restricción calórica, la inhibición de las vías de señalización detectoras de nutrientes, controladas por Sch9p, Tor, y Ras activan a la cinasa Rim15p. A su vez los factores transcripcionales Msn2/4p y Gis1p activan genes de respuesta a estrés para incrementar la protección celular, lo que lleva a extender su ciclo cronológico. De igual forma, bajo restricción calórica, la pérdida de Sir2p en células posmitóticas conlleva a un incremento en la resistencia a estrés y en la longevidad. Sin embargo, durante el crecimiento vegetativo, Sir2p es necesaria para reprimir la formación de ERCs y retrasar el envejecimiento. Tomado y modificado de Fabrizio *et al.*, (2005) y Wei *et al.*, (2008)

En resumen, la actividad de desacetilasa de Sir2p es importante para preservar el potencial replicativo de las células mitóticas, pero en la célula posmitótica, la pérdida de la sirtuina parece favorecer la transición hacia un estado protector que la defiende contra el envejecimiento durante la falta de nutrientes (figura 7). Esta dualidad funcional de Sir2p, aparentemente contradictoria con respecto al envejecimiento, es actualmente objeto de extenso debate (Agarwal *et al.*, 2005; Guarente, 2008; Hipkiss, 2008; Kaeberlein *et al.*, 2007). Es posible que el incremento gradual de las ERO asociadas al envejecimiento conlleve a la inactivación de Sir2p en los dos modelos. Durante el envejecimiento replicativo, dicha pérdida de actividad por “oxidación” de Sir2p, explicaría por qué las células mitóticas seniles acumulan gran cantidad de ERCs y también por qué pierden la capacidad de dividirse asimétricamente. También es posible que la inactivación progresiva de esta sirtuina conlleve a la inducción de genes de respuesta a estrés,

que bajo condiciones fisiológicas le permitan a la célula madre silvestre adaptarse al estrés oxidante que se genera en ella a medida que envejece. En cambio, el corto ciclo replicativo de la mutante en *SIR2*, puede deberse a que la acumulación masiva de ERCs sea tan veloz que aunque exista inducción de la REO, esta sea insuficiente para contrarrestar los efectos negativos de la ausencia de la sirtuina.

En células posmitóticas, también se incrementan los niveles de ERO endógenas a través del tiempo (Rockenfeller and Madeo, 2008) entonces es posible que Sir2p también pierda gradualmente actividad. La inducción paulatina de los factores de respuesta a estrés y de Adh2p como consecuencia de la desactivación gradual de Sir2p, probablemente contribuyan a la adaptación de la célula cronológicamente senescente, a la vez que también la condenan por incrementar los ERCs. La posible explicación del porqué se incrementa tan sustancialmente la longevidad en ausencia de Sir2p bajo restricción calórica, pudiera ser la siguiente: en ausencia de nutrientes se reprimen fuertemente las vías Sch9p, Tor y Ras. En respuesta a este estímulo, Rim15p induce potentemente los factores transcripcionales de respuesta a estrés porque todo el tiempo son transcripcionalmente permisibles, pues al estar ausente, Sir2 no ejerce ningún control negativo sobre ellos. El resultado es que se podrían atenuar significativamente los efectos adversos de las ERO. Además, en ausencia de Sir2p, la enzima Adh2p pudiera ser rápidamente transcrita y acelerar la degradación del etanol para entrar tempranamente a fase estacionaria. Posiblemente los efectos en este modelo no son vistos en una cepa silvestre por la cinética de los acontecimientos; es decir la inducción de la REO pudiera ser más lenta porque primero debe desactivarse la sirtuina para permitir la transcripción de los factores de respuesta a estrés. Sin embargo, éstas suposiciones no explican por qué la célula posmitótica mutante en *SIR2*, que también acumula altos niveles de ERCs, no es tan afectada por estos elementos que dañan tan significativamente a la célula replicativa, tal vez la clave se encuentra en el estado metabólico de estos dos estadios celulares.

De cualquier forma, la participación de Sir2p en este proceso resalta la complejidad de los eventos celulares que ocurren durante la senescencia, a la par que apoyan la hipótesis de los radicales libres como mediadores del envejecimiento.

1.10 LA DESACETILASA DE HISTONAS Hst1p.

En el modelo de envejecimiento replicativo, Sir2p claramente participa en la modulación de la senectud y, aún cuando el mecanismo exacto no se conoce, es evidente que guarda relación con una adecuada respuesta a estrés oxidante en la célula hija (Erjavec and Nystrom, 2007). Sin embargo poco se ha documentado acerca del papel que juegan en este proceso los genes parálogos a *SIR2*, las sirtuinas *HST1-4* (del inglés *Homolog of SIR Two*) y los reportes que existen al respecto, también han sido extensamente debatidos (Kaeberlein *et al.*, 2006)

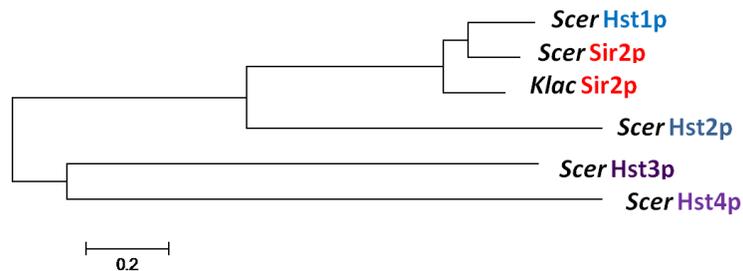


Figura 8. Árbol filogenético de las sirtuinas en *S. cerevisiae*. El análisis está basado en las secuencias de aminoácidos de las Sir2p de *Saccharomyces cerevisiae* y sus parálogos (Hst1-4p), y en la secuencia de Sir2p de *Kluyveromyces lactis*. El árbol se construyó por el método del vecino más cercano (*Neighbour-Joining*), donde la longitud de las ramas representa la distancia evolutiva inferida y el número en la parte inferior la cantidad de sustituciones de aminoácidos por sitio.

Los genes *SIR2* y sus homólogos se derivaron de la duplicación genómica que experimentó el ancestro de *Saccharomyces* hace más de 100 millones de años. La figura 8 muestra que Hst1p es el parálogo más cercano a Sir2p. A nivel de secuencia proteica son 67% similares y conservan principalmente el núcleo catalítico y algunas regiones en los extremos N y C terminal. Sin embargo aún cuando ambas proteínas operan como mediadores del silenciamiento poseen funciones no sobrelapantes (Brachmann *et al.*, 1995). Para explicar este fenómeno, se ha propuesto que el gen ancestral de estas sirtuinas se duplicó y

gradualmente acumuló mutaciones que dieron origen a los actuales genes *SIR2* y *HST1*, en donde cada uno conservó una función del gen original (subfuncionalización) (Hickman and Rusche, 2007). Algunos estudios *in vitro* demuestran que en ausencia de alguno de estos genes, la sobreexpresión del parálogo sustituye al gen faltante, por lo que se ha sugerido que de esta forma la célula se protege contra posibles mutaciones que le lleven a la pérdida de alguno de ellos (Brachmann *et al.*, 1995; Hickman and Rusche, 2007).

En *S. cerevisiae* Sir2p opera mediante silenciamiento transcripcional regional, mientras que Hst1p actúa como un represor local de un juego selecto de promotores. Las diferencias entre los extremos N terminales de estas sirtuinas, determinan los factores a los que se unen y los genes que silencian (Mead *et al.*, 2007). Sir2p en conjunto con Sir3 y 4p, reprimen regiones subteloméricas y los *loci HM*. En cambio Hst1p en interacción con la proteína Rfm1p, es reclutada por el factor transcripcional Sum1p para formar un complejo represor específico. La especificidad de este modulador transcripcional la confiere Sum1p al reconocer la secuencia MSE (del inglés *Middle Sporulation Element*; AGYGWACAAAAK o GYGWASWAAW) [donde Y corresponde a C o T, W a A o T, K a G o T y S a G o C]. Se ha descrito que el silenciamiento de genes de la esporulación intermedia durante el crecimiento vegetativo, depende de Hst1p (Xie *et al.*, 1999).

En *S. cerevisiae* el complejo Hst1/Rfm1/Sum1 (HRS), también reprime genes biosintéticos *de novo* de la ruta de la quinurenina para la síntesis de NAD⁺, y genes del transporte su precursor, el ácido nicotínico (Bedalov *et al.*, 2003). Debido a su menor afinidad por el cofactor, se ha propuesto que Hst1p actúa como un detector que regula a las sirtuinas y el estado metabólico a través del control de los niveles de NAD⁺ intracelulares (Bedalov *et al.*, 2003).

Al igual que *S. cerevisiae*, *C. glabrata* cuenta con el gen *SIR2* y sus cuatro parálogos. Por análisis de secuencia y sintenia se ha determinado que el gen CAGL0K01463g corresponde a *SIR2* y el gen CAGL0C05357g a *HST1*. Hasta el momento no se ha caracterizado un ciclo sexual para esta levadura, por lo que se desconoce cuál pudiera ser el papel de los genes de la esporulación en *C. glabrata*. Estudios recientes indican que en *C. glabrata* se conserva la actividad de

Hst1p en la regulación de los niveles intracelulares de NAD⁺. Como resultado de la estrecha interacción con el hospedero, esta levadura ha experimentado una evolución reductiva y se ha vuelto auxótrofa para NAD⁺. No obstante, conserva las rutas de salvamento que utilizan precursores para sintetizarlo. Se ha reportado que Hst1p controla negativamente los genes involucrados en el transporte de los precursores del NAD⁺ (niacina). Durante la limitación de niacina, Hst1p se inactiva y permite la transcripción de los transportadores *TNA1*, *TNR1* y *TNR2*. para restablecer las concentraciones fisiológicas del cofactor (Ma *et al.*, 2009).

El resto de las funciones celulares que regula Hst1p en *C. glabrata* comienzan por ser elucidadas. Por medio de ensayos de sensibilidad a estrés oxidante llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo, detectamos que existen algunas células que crecen a una elevada concentración de peróxido aún sin recibir previamente una dosis baja para su adaptación. Tras descartar que la resistencia se debiera a mutaciones supresoras, se dedujo que existen poblaciones celulares que poseen genes de REO epigenéticamente activados. Dentro de los mecanismos epigenéticos, se encuentran aquellos mediados por enzimas que controlan la transcripción al modificar las histonas y estructura de la cromatina. Es por ello que se exploró la sensibilidad a peróxido de varias cepas nulas en proteínas del silenciamiento. Se encontró que sólo las mutantes *hst1Δ* son más resistentes a H₂O₂ en fase logarítmica. Además, los datos generados por Israel Cañas-Villamar (2007), indican que la resistencia a estrés oxidante en la mutante *hst1Δ* está mediada por la catalasa. Este fenotipo exclusivo de *HST1* y no de *SIR2* u otros parálogos sugieren que esta sirtuina pudiera participar como un regulador negativo temprano en la REO de *C. glabrata*. Por último, gracias a datos de nuestro laboratorio conocemos que cepas mutantes nulas en *HST1* incrementan significativamente su resistencia a fluconazol y sutilmente la adherencia a células epiteliales humanas (De Las Peñas *et al.*, datos no publicados).

Por análisis de secuencias y de microarreglos generados previamente por Hirao *et al* (2003) y Ma *et al* (2009), determinamos que a pesar de la estrecha similitud entre las sirtuinas (74%), Hst1p de *C. glabrata* silencia un juego de genes

muy distinto al que controla su ortólogo en *S. cerevisiae*. La comparación de los perfiles transcripcionales de mutantes nulas de *HST1* para *S. cerevisiae* (Hirao *et al.*, 2003) y *C. glabrata* (Ma *et al.*, 2009), revelan que de los genes diferencialmente expresados (>2 veces) sólo se comparten 19 de ellos, indicativo de que estas proteínas regulan un juego muy distinto de genes en ambos organismos. Además los datos del microarreglo de Ma y cols. (2009), revelan que Hst1p regula negativamente genes dispersos por todo el genoma con potencial relevancia en la virulencia del patógeno. Algunos de ellos están implicados en la REO y en la resistencia a fluconazol.

Mediante el análisis de secuencias proteicas de varias sirtuinas en diferentes especies de levaduras, detectamos otro hallazgo importante (figura 9). Identificamos que todas estas sirtuinas conservan un dominio CPYC, dentro del pliegue de Rossman, específicamente en el motivo de unión a Zinc, que es indispensable para la unión de la proteína con su sustrato (Min *et al.*, 2001). Esta secuencia de aminoácidos también está altamente conservada en el sitio activo de las glutaredoxinas Grx1 y Grx2, que son tiol-disulfuro oxidoreductasas cuyo mecanismo de acción implica reacciones de oxidación en las cisteínas de este dominio para responder ante el estrés oxidante (Foloppe and Nilsson, 2004). La presencia de estos aminoácidos sugiere que posiblemente las sirtuinas sean susceptibles a oxidación y de esta forma el balance oxidoreductor celular module la actividad de las sirtuinas.

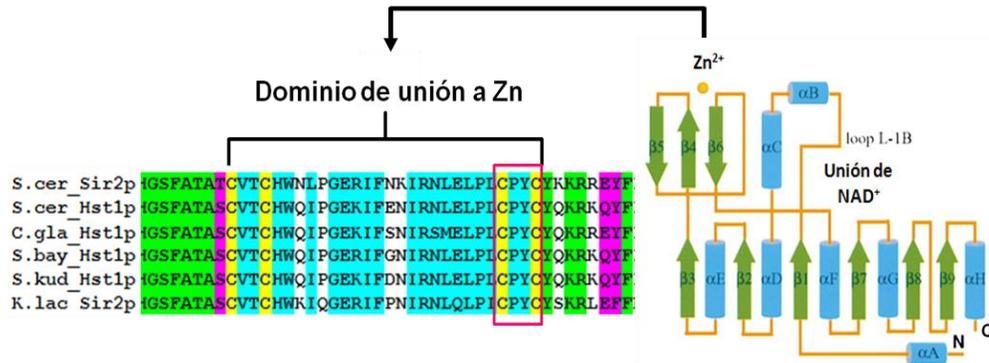


Figura 9. Segmento comparativo del alineamiento múltiple de secuencias proteicas de sirtuinas y sus ortólogos en otras especies de levaduras. Mediante un alineamiento global por CLUSTAL/W, se compararon las secuencias Sir2p de *S. cerevisiae* y *K. lactis*; con Hst1p de *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii* y *C. glabrata*. Dentro del motivo conservado de unión a zinc [Cys-X-X-Cys(X)15–20-Cys-X-X-Cys] se ha colocado en un rectángulo los cuatro aminoácidos (CPYC) que comparten con el sitio activo de las glutaredoxinas. En la parte derecha, se muestra un esquema de la desacetilasa de histonas Sir2p de *S. cerevisiae*. La flecha indica el dominio de unión a zinc y la parte interna representa la región implicada en la unión del NAD⁺.

C. glabrata es un patógeno oportunista cuyos factores de virulencia comienzan a ser descifrados. El presente trabajo busca contribuir al entendimiento de los mecanismos que regulan la eficiente REO y la elevada resistencia a fluconazol de *C. glabrata*, así como su implicación en la virulencia. Particularmente estamos interesados en descifrar el papel de Hst1p como regulador de ambos procesos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MEDIOS DE CULTIVO Y CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*.

Para el aislamiento de plásmidos a partir de cultivos de las cepas de *E. coli* DH10B, DH10*pcnB*⁻ o *Stb12* (tabla 2), se utilizó medio Luria-Bertani (LB). El medio contiene extracto de levadura 5g/L, triptona 10g/L y NaCl 5g/L. En la mayoría de los casos se suplementó con carbenicilina (A. G. Scientific[®]) a una concentración final de 50µg/mL (LB-Cb50). Para medio LB sólido, con o sin carbenicilina, se añadió agar bacteriológico a una concentración final de 2% (w/v). La solución de almacenamiento y transformación (TSS) fue utilizada para hacer *in situ* cepas bacterianas competentes. La solución se constituye por LB con 10% (w/v) de polietilenglicol (Fluka Biochemica[®]) (3350), MgCl₂ 100mM y dimetilsulfóxido (DMSO Sigma-Aldrich[®]) 5% (v/v) a pH de 6,5. Finalmente, para la recuperación de cepas bacterianas competentes, se utilizó medio SOC. Este medio rico contiene extracto de levadura 5g/L, triptona 20g/L, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgSO₄ 10mM, MgCl₂ 10mM y glucosa a una concentración final de 0.4% (w/v).

Tabla 2. Cepas de *Escherichia coli*

Cepa	Genotipo	Comentario	Referencia
DH10B	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80dlacZΔM15ΔlacX74 deoR recA1</i> <i>endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU</i> <i>galK λ⁻ rpsL nupG</i>	Células electrocompetentes.	(Calvin and Hanawalt, 1988)
DH10<i>pcnB</i>⁻	DH10B <i>pcnB</i> ⁻	Reduce el número de copias de productos aberrantes.	(Lopilato <i>et al.</i> , 1986)
<i>Stb12</i>	<i>F- mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr)</i> <i>recA1 endA1lon gyrA96 thi supE44</i> <i>relA1 λ- Δ(lac-proAB)</i>	Permite clonar insertos inestables o con secuencias repetidas directas.	Invitrogen [®] No. Cat. 10268-019

Las cepas de *C. glabrata* se cultivaron en medio YPD (del inglés *Yeast extract-Peptone-Dextrose*). El medio contiene extracto de levadura 10g/L, peptona 20g/L, glucosa 2%(p/v) y es complementado con 25mg/L de uracilo (Sigma Aldrich[®]). Cuando fue requerido, se suplementó con higromicina (A. G. Scientific[®]) a una concentración final de 400µg/mL. Para ensayos de sensibilidad a fluconazol (Diflucan[®] de Pfizer[®]) el YPD se suplementó con diferentes concentraciones del fármaco (16, 32, 64, 128 y 256µg/mL). El medio YPG es parecido al YPD, pero contiene glicerol 3% (w/v) como fuente de carbono en vez de glucosa. El medio

casaminoácidos (CAA), se compone de base nitrogenada de levadura sin amonio 1,7g/L, sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄] 5g/L, casaminoácidos 6g/L y de glucosa 2% (w/v). Cuando fue necesario, se suplementó con uracilo 50mg/L y de ácido-5-fluorótico 0,9g/L (Toronto Research Chemicals®), para dar lugar al medio 5-FOA. Para los medios sólidos se añadió agar bacteriológico a concentración final de 2% (w/v).

2.2 CEPAS DE *C. glabrata*.

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la tabla 3. De cada una se resguardan dos colonias independientes en glicerol al 15% a -80°C.

La cepa silvestre del laboratorio BG14, posee una mutación nula por inserción con el transposón Tn903 [Tn903 *npt* (Neo^R G418^R)] en el gen *URA3*, por lo que todas las cepas derivadas de ella son auxótrofas de uracilo (Cormack and Falkow, 1999). Los cultivos líquidos se incubaron con agitación rotatoria y tanto sólidos o como líquidos se incubaron a 30°C.

Tabla 3. Cepas de *Candida glabrata*

Cepa	Parental	Genotipo	Comentario	Referencia
BG2	—	Aislado clínico (Cepa B)	—	(Fidel <i>et al.</i> , 1996)
BG14 wt	BG2	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i>	Silvestre Ura ⁻ , Hyg ^S	(Cormack and Falkow, 1999)
CGM71 <i>sir2Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R sir2Δ::hph</i>	<i>sir2Δ</i> Ura ⁻ , Hyg ^R	Colección del laboratorio.
CGM76 <i>hst1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R hst1Δ::hph</i>	<i>hst1Δ</i> Ura ⁻ , Hyg ^R	Colección del laboratorio.
CGM84 <i>hst1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R hst1Δ</i>	<i>hst1Δ</i> Ura ⁻ , Hyg ^S	Colección del laboratorio.
CGM295 <i>cta1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R cta1Δ::hph</i>	<i>cta1Δ</i> Ura ⁻ , Hyg ^R	Colección del laboratorio.
CGM323 <i>hst1Δ/cta1Δ</i>	CGM84	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R hst1Δ/cta1Δ::hph</i>	<i>hst1Δ/cta1Δ</i> Ura ⁻ , Hyg ^R	Colección del laboratorio.
CGM673 <i>sum1Δ</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R sum1Δ::hph</i>	<i>sum1Δ</i> Ura ⁻ , Hyg ^R	Colección del laboratorio.
CGM712 <i>hst1Δ/sir2Δ</i>	CGM84	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R hst1Δ/sir2Δ::hph pAP596/SacI-KpnI</i>	<i>hst1Δ/ sir2Δ</i> Ura ⁻ , Hyg ^R	Este trabajo.
CGM718 wt/pOZ40	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R pOZ40 (CgCEN/ARS URA3 HST1::c-myc13)</i>	Silvestre (<i>HST1::c-myc13</i>) Ura ⁺ , Hyg ^S	Este trabajo.

CGM728 <i>hst1Δ/pOZ40</i>	CGM84	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> pOZ40 (<i>CgCEN/ARS URA3</i> <i>HST1::c-myc13</i>)	<i>hst1Δ</i> (<i>HST1::c-myc13</i>) Ura ⁺ , Hyg ^S	Este trabajo.
CGM730 <i>hst1Δ/pGRB2.0</i>	CGM84	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> pGRB2.0(<i>CgCEN/ARS</i> <i>URA3</i>)	<i>hst1Δ</i> Ura ⁺ , Hyg ^S	Este trabajo.
CGM736 <i>sum1Δ/pOZ40</i>	CGM673	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> pOZ40 (<i>CgCEN/ARS URA3</i> <i>HST1::c-myc13</i>)	<i>sum1Δ</i> (<i>HST1::c-myc13</i>) Ura ⁺ , Hyg ^S	Este trabajo.
CGM738 <i>sum1Δ/pGRB2.0</i>	CGM673	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> pGRB2.0 (<i>CgCEN/ARS</i> <i>URA3</i>)	<i>sum1Δ</i> Ura ⁺ , Hyg ^S	Este trabajo.
CGM744 <i>wt/pGRB2.0</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> pGRB2.0(<i>CgCEN/ARS</i> <i>URA3</i>)	Silvestre Ura ⁺ , Hyg ^S	Este trabajo.
CGM746 <i>wt/pOZ44</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> pOZ44 (<i>Cg CEN/ARS URA3</i> <i>HST1</i>)	Silvestre (<i>HST1</i>) Ura ⁺ , Hyg ^S	Este trabajo.
CGM748 <i>hst1Δ/pOZ44</i>	CGM84	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> pOZ44 (<i>Cg CEN/ARS URA3</i> <i>HST1</i>)	<i>hst1Δ</i> (<i>HST1</i>) Ura ⁺ , Hyg ^S	Este trabajo.
CGM750 <i>sum1Δ/pOZ44</i>	CGM673	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> pOZ44 (<i>CgCEN/ARS URA3</i> <i>HST1</i>)	<i>sum1Δ</i> (<i>HST1::c-myc13</i>) Ura ⁺ , Hyg ^S	Este trabajo.
CGM821 <i>HST1::GFP</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> pOZ30/SpeI-BlpI (<i>HST1::GFP::hph</i>)	Silvestre (<i>HST1::GFP</i>) Ura ⁻ , Hyg ^R	Este trabajo.
CGM823 <i>HST1::c-myc13</i>	BG14	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i> pOZ32/XmnI-BlpI (<i>HST1::c-myc13::hph</i>)	Silvestre (<i>HST1::c-myc13</i>) Ura ⁻ , Hyg ^R	Este trabajo.

2.3 PLÁSMIDOS.

Los plásmidos utilizados en este estudio se describen en la tabla 4. Los plásmidos se introdujeron por electroporación o mediante la solución de almacenamiento y transformación (TSS) en alguna de las cepas bacterianas usadas en este estudio. Todas las cepas que contienen a estos plásmidos se encuentran resguardadas por duplicado en glicerol al 10% a -80°C.

Tabla 4. Plásmidos		
VECTORES DE CLONACIÓN		
Plásmido	Descripción y/o genotipo relevante	Referencia
pGEM[®]-T	Vector de clonación. Amp ^R .	Promega [®] No. Cat.: A3600
pYIPlac211	Vector de clonación integrativo. <i>URA3</i> Amp ^R .	(Gietz and Sugino, 1988)
pGRB2.0	Vector de clonación replicativo. <i>CgCEN/ARS URA3</i> Amp ^R .	(Domergue <i>et al.</i> , 2005)

pRS416	Vector de clonación replicativo. <i>ScCEN/ARS URA3 Amp^R</i> .	(Sikorski and Hieter, 1989)
pOZ16	Vector para crear fusiones traduccionales con <i>GFP</i> . Fragmento BamHI/BglII de 0,725Kb (<i>GFP</i>) derivado de pAP742, clonado en pOZ14 digerido con BamHI. Se seleccionó la orientación con el ORF de <i>GFP</i> en dirección 5' → 3'. [<i>GFP::(FRT-3'UTR_{CTAI})P_{PGK}::hph::(3'UTR_{HIS3})-FRT</i>]; <i>URA3 Hyg^R Amp^R</i> .	Este trabajo.
pOZ18	Vector para crear fusiones traduccionales con <i>c-myc13</i> . Fragmento BamHI/BglII de 0,563Kb (<i>c-myc13</i>) derivado de pAP760, clonado en pOZ14 digerido con BamHI. Se seleccionó la orientación con el <i>c-myc13</i> en dirección 5' → 3'. [<i>c-myc13::(FRT-3'UTR_{CTAI})P_{PGK}::hph::(3'UTR_{HIS3})-FRT</i>]; <i>URA3 Hyg^R Amp^R</i> .	Este trabajo.
VECTORES PARA MUTACIONES GÉNICAS		
Plásmido	Descripción y/o genotipo relevante	Referencia
pAP596 <i>sir2Δ</i>	Vector para construcción de mutante nula en <i>SIR2</i> . Un casete de resistencia a higromicina, flanqueado en el extremo 5' por 0,583Kb de la región promotora de <i>SIR2</i> y en el 3' por 0,828Kb del terminador de <i>SIR2</i> . [5' <i>SIR2</i> -P _{PGK} :: <i>hph</i> ::(3'UTR _{HIS3})-(3'UTR _{SIR2})] ; <i>URA3 Hyg^R Amp^R</i> .	Colección del laboratorio.
pOZ30 <i>HST1::GFP</i>	Fragmento <i>SpeI/BglII</i> de 0,608Kb (3'ORF <i>HST1</i>) derivado de pAP754, clonado en pOZ20 digerido con <i>SpeI/BamHI</i> . [3'ORF <i>HST1::GFP::(FRT-3'UTR_{CTAI})P_{PGK}::hph::(3'UTR_{HIS3})-FRT-(3'UTR_{HST1})] ; <i>URA3 Hyg^R Amp^R</i>. Para fusión traduccional de <i>HST1</i> con <i>GFP</i>.</i>	Este trabajo.
pOZ32 <i>HST1::c-myc13</i>	Fragmento <i>SacI/BglII</i> de 0,654Kb (3'ORF <i>HST1</i>) derivado de pAP754, clonado en pOZ22 digerido con <i>SacI/BamHI</i> . [3'ORF <i>HST1::c-myc13::(FRT-3'UTR_{CTAI})P_{PGK}::hph::(3'UTR_{HIS3})-FRT-(3'UTR_{HST1})] ; <i>URA3 Hyg^R Amp^R</i>. Para fusión traduccional de <i>HST1</i> con <i>c-myc13</i>.</i>	Este trabajo.
VECTORES REPLICATIVOS		
Plásmido	Descripción y/o genotipo relevante	Referencia
pOZ40 <i>(HST1::c-myc13)</i>	Fragmento <i>SacI/SalI</i> de 3,02Kb derivado de pOZ38, clonado en pGRB2.0 digerido con <i>SacI/SalI</i> . Vector replicativo con el ORF de <i>HST1</i> fusionado al epítipo <i>c-myc13</i> en el C-terminal, con 0,387Kb al 5' y 0,52Kb del 3'UTR. [5' <i>HST1HST1::c-myc13</i> (3'UTR _{HST1})] ; <i>CgCEN/ARS URA3 Amp^R</i> . Para complementar ectópicamente a <i>hst1Δ</i> .	Este trabajo.
pOZ44 <i>(HST1)</i>	Para complementar ectópicamente a <i>hst1Δ</i> . Fragmento <i>SacI/SalI</i> de 2,444Kb derivado de pOZ42, clonado en pGRB2.0 digerido con <i>SacI/SalI</i> . Vector replicativo con el ORF de <i>HST1</i> silvestre, con 0,387Kb al 5' y 0,52Kb del 3'UTR. [5' <i>HST1HST1</i> (3'UTR _{HST1})] ; <i>CgCEN/ARS URA3 Amp^R</i> . Para complementar ectópicamente a <i>hst1Δ</i> .	Este trabajo.
pMZ18	Vector replicativo que expresa la recombinasa (<i>ScFlp1p</i>) para la remoción del casete de resistencia a higromicina; [P _{EPA1} :: <i>FLP1</i> ::(3'UTR _{HIS3}) <i>URA3 Amp^R</i> .	Colección del laboratorio B. Cormack.

VECTORES PARA OBTENCIÓN DE GENES POR PCR		
Plásmido	Descripción y/o genotipo relevante	Referencia
pFA6a-13Myc-KanMX6	Vector de clonación que contiene el epítipo <i>c-myc</i> . Para obtención del epítipo <i>c-myc13</i> por PCR; Km ^R Amp ^R .	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)
pAP300	Vector de clonación que contiene el ORF de <i>GFP</i> . Para obtención del ORF <i>GFP</i> por PCR; Km ^R Amp ^R .	Colección del laboratorio.
VECTORES INTERMEDIARIOS		
Plásmido	Descripción y/o genotipo relevante	Referencia
pAP764	Vector de clonación con un casete de resistencia a higromicina, flanqueado por una secuencia <i>FRT</i> al extremo 3'. [<i>P_{PGK}::hph::(3' UTR_{HIS3})-FRT</i>]; <i>URA3</i> Hyg ^R Amp ^R .	Colección del laboratorio.
pAP742	Producto de PCR (oligos #410 y #409) de 0,742Kb del ORF de <i>GFP</i> derivado de pAP300, clonado en pGEM [®] -T. Amp ^R .	Colección del laboratorio.
pAP754	Producto de PCR (oligos #386 y #385) de 0,616Kb del 3' del ORF de <i>HST1</i> sin codón de paro, clonado en pGEM [®] -T. Amp ^R .	Colección del laboratorio.
pAP755	Producto de PCR (oligos #383 y #384) de 1,023Kb de la región 3'UTR de <i>HST1</i> , clonado en pGEM [®] -T. Amp ^R .	Colección del laboratorio.
pAP760	Producto de PCR (oligos #407 y #408) de 0,575Kb de <i>c-myc13</i> , derivado de pFA6a-13Myc-KanMX6 y clonado en pGEM [®] -T. Amp ^R .	Colección del laboratorio.
pOZ1	Producto de PCR (oligos #313 y #314) de 0,526Kb de la región 3'UTR de <i>HST1</i> , clonado en pGEM [®] -T. Amp ^R .	Este trabajo.
pOZ3	Producto de PCR (oligos #311 y #316) de 1,908Kb, que consiste en 0,381Kb de la región 5' y el ORF de <i>HST1</i> sin codón de paro, clonado en pGEM [®] -T. Amp ^R .	Este trabajo.
pOZ5	Producto de PCR (oligos #317 y #318) de 0,565Kb de <i>c-myc13</i> , derivado de pFA6a-13Myc-KanMX6 y clonado en pGEM [®] -T. Amp ^R .	Este trabajo.
pOZ12	Producto de PCR (oligos #351 y #465) de 0,341Kb de la región 3'UTR de <i>CTA1</i> con un sitio <i>FRT</i> , clonado en pGEM [®] -T. Amp ^R .	Este trabajo.
pOZ14	Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Bg</i> III de 0,325Kb (<i>FRT</i> -3'UTR _{<i>CTA1</i>}) derivado de pOZ12, clonado en pAP764 digerido con <i>Bam</i> HI. <i>URA3</i> Hyg ^R Amp ^R . Selección de la orientación con las secuencias <i>FRT</i> repetidas directas.	Este trabajo.
pOZ20	Fragmento <i>Sal</i> I/ <i>Kpn</i> I de 1,011Kb (3'UTR _{<i>HST1</i>}) derivado de pAP755, clonado en pOZ16 digerido con <i>Sal</i> I/ <i>Kpn</i> I. <i>URA3</i> Hyg ^R Amp ^R .	Este trabajo.
pOZ22	Fragmento <i>Sal</i> I/ <i>Kpn</i> I de 1,011Kb (3'UTR _{<i>HST1</i>}) derivado de pAP755, clonado en pOZ18 digerido con <i>Sal</i> I/ <i>Kpn</i> I. <i>URA3</i> Hyg ^R Amp ^R .	Este trabajo.
pOZ24	Fragmento <i>Sac</i> I/ <i>Sal</i> I de 1,946Kb (5' _{<i>HST1</i>} <i>HST1</i>) derivado de pOZ4, clonado en pYIPlac211 digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Sal</i> I. <i>URA3</i> Amp ^R .	Este trabajo.
pOZ26	Fragmento <i>Xho</i> I/ <i>Pst</i> I de 0,571Kb (<i>c-myc13</i>) derivado de pOZ5, clonado en pOZ24 digerido con <i>Xho</i> I/ <i>Pst</i> I. <i>URA3</i> Amp ^R .	Este trabajo.
pOZ28	Fragmento <i>Pst</i> I/ <i>Hind</i> III de 0,52Kb (3'UTR _{<i>HST1</i>}) derivado de pOZ1, clonado en pOZ26 digerido con <i>Pst</i> I/ <i>Hind</i> III. <i>URA3</i> Amp ^R .	Este trabajo.
pOZ38	Fragmento <i>Sac</i> I/ <i>Hind</i> III de 3,0Kb derivado de pOZ28, clonado en pRS416 digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Hind</i> III. [<i>5'</i> _{<i>HST1</i>} <i>HST1::c-myc13(3'UTR_{<i>HST1</i>})</i>] <i>ScCEN/ARS URA3</i> Amp ^R .	Este trabajo.
pOZ42	Fragmento de 2,04Kb, derivado de la digestión <i>Sac</i> I/ <i>Hind</i> III de un producto de PCR (oligos #311 y #414) del ORF de <i>HST1</i> con 0,387Kb al 5' y 0,52Kb del 3'UTR, clonado en pRS416 digerido con <i>Sac</i> I/ <i>Hind</i> III. [<i>5'</i> _{<i>HST1</i>} <i>HST1(3'UTR_{<i>HST1</i>})</i>] <i>ScCEN/ARS URA3</i> Amp ^R .	Este trabajo.

2.4 OLIGONUCLEÓTIDOS.

Los oligonucleótidos (Elim Biopharmaceuticals, Inc.) utilizados para la construcción de plásmidos y el diagnóstico de mutaciones o inserciones, por la técnica de PCR, se describen en la tabla 5. Todos se utilizan en concentración final de 250-300nM en las reacciones de PCR.

Tabla 5. Oligonucleótidos [†]			
#	Nombre	Secuencia 5'→3'	Sitios
13	pUC Fw	GGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG	—
14	pUC Rv	TATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGA	—
15	P-PGK Rv out	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG	—
16	3'UTRHIS3 Fw out	AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG	—
17	pUC Rv2	GGAAACAGCTATGACCATGA	—
84	SIR2@249 Fw	GAATGTCAAGGACGGGAAG	—
85	SIR2@546 Rv	CAATAGACGAATGGTGAAC	—
88	HST1@+1306 Rv	AAGAGCTAAGAGAACTTTGTCCTCCGTC	—
311	HST1@-397SacI Fw	CGGGAGAGTTC GAGCTC AAAAGTG	SacI
312	HST1@-468bp Fw	GGAAAGAAGTCTTCTCTGCGAG	—
313	HST1@+1PstI Fw	CG ACTGCAG ACCGCTCATTGTTTTTATA ATAG	PstI
314	HST1@+519HindIII Rv	CGG AAGCTT TCGCCAAGAGACACG	HindIII
315	HST1@+561bp Rv	GAAAAGATGGTTAACCAAGCCG	—
316	HST1@1527XhoI Rv	CG ACTCGAG TTCAGGAGAACCAGCCTC	XhoI
317	Myc@-12XhoI Fw	CGCT CTCGAG GGGAGGGATCGCCGGGTTA ATTAAC	XhoI
318	Myc@+14PstI Rv	CGG CTGCAG CGCGAATCCACTAGTGATTG	PstI
351	CTA1@+290bpBglII Rv	GCG AGATCT TCTATGAATTAAGACATAACA TCAAGTCCC	BglII
383	HST1@+1SalI Fw	GCG GTCGAC ACCGCTCATTGTTTTTATA ATAGA	SalI
384	HST1@+1000bpKpnIBsgI Rv	GCG GGTACCG TGCAGTACGGTGCCGCTGT TC	KpnI
385	HST1@1527BglII Rv	AGATCT TTTTTCAGGAGAACCAGCCTC	BglII
386	HST1@917bpSpeI Fw	AA ACTAGT TCAATGTTCATGGCTC	SpeI
407	13MycBamHI Fw	GCG GGATCC TAGGGTTAATTAACGGTG	BamHI
408	13MycBglII Rv	CGC AGATCT GGCGCGAATTCAGTAGT TG	BglII
409	GFP@715bpBglII Rv	CGC AGATCT TTATTTGTACAATTCATCCAT ACC	BglII
410	GFP@1bpBamHI Fw	GCG GGATCC TAATGTCTAAAGGTGAAGA ATTATTC	BamHI
465	CTA1@+1bpBamHI FRT Fw	GCG GGATCCGAAGTTCCTATACTTTCTAG AGAATAGGA ACTTCGTGCGCT	BamHI FRT
502	HST1@540bpEcoRI Fw	AGCAACA GAATTC GATTATCC	EcoRI
504	HST1@449bp Fw	CGAATATGAAGATTTCACTGATCC	—

523	SIR2@-1165bp Fw	CAACCGCTGAAATTATTAGAGCCACG	—
524	SIR2@+982bp Rv	TTGGGCAGAGGTGTTCAACTCTAGACC	—

† El nombre del oligonucleótido indica la posición del gen en donde hibrida y los sitios de restricción que posee. Números sin signo son coordenadas dentro del ORF, mientras que negativos y positivos indican que la hibridación es al extremo 5' o 3' UTR del gen, respectivamente. Fw denota orientación en sentido y Rv la antisentido. El sitio de restricción se muestra en negritas y subrayado.

2.5 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *C. glabrata*.

Para transformar genéticamente a *C. glabrata* con ADN lineal o superenrollado se utilizó una modificación del método de transformación con acetato de litio (LiAcO) (Gietz *et al.*, 1992). Cada cepa a transformar se creció en medio YPD durante la noche. Al día siguiente, se transfirieron 0,3mL de este inóculo a 30mL de YPD fresco (dilución 1:100) y se incubó con agitación hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,8-1,0. Las células se colectaron por centrifugación y se lavaron con un volumen equivalente de agua estéril. Posteriormente se concentraron 100 veces en LiAcO 100mM y se dividieron en alícuotas de 50µL c/u. Para cada transformación, a una alícuota de células se le añadieron 240µL de polietilenglicol 50% Fluka Biochemica® (PM 400) (concentración final ~30%), 36µL de LiAcO 1M (concentración final ~90mM), 25µL de ADN acarreador de cadena sencilla (Invitrogen® 2mg/mL) desnaturalizado por calor (concentración final ~125ng/µL) y el ADN a transformar, resuspendido en un volumen de 50 µL de Tris 10mM. La mezcla se incubó a 30°C por 45min, después se le agregaron 43µL de DMSO y se sometió a choque térmico por 15min a 42°C. Por último, las células se centrifugaron para retirar el PEG y dependiendo del tipo de selección a realizar, se resuspendieron en agua o en medio YPD. Para la selección de transformantes que complementen la auxotrofia por uracilo, las células fueron resuspendidas en 600µL de agua y se sembraron en dos cajas con medio CAA; una con 50µL de la suspensión y otra con 100µL. Para la selección con higromicina se resuspendieron en 1mL de YPD y se incubaron al menos 4h a 30°C. Al término de este periodo, se sembraron 200, 300 y 400µL en cajas con medio YPD-Hyg. Todas las cajas se incubaron a 30°C, al menos durante 48 horas.

Se eligieron en promedio 8 colonias de cada transformante y se purificaron dos veces en medio de selección adecuado (CAA o YPD-Hyg.). Se estriaron en medio YPG para analizar su capacidad de utilizar glicerol como fuente de carbono no fermentable y de este modo descartar que hayan presentado mutaciones que alteraran su función mitocondrial (*petit*). Posteriormente se extrajo ADN genómico y se diagnosticó por PCR la modificación genética correspondiente.

2.6 ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

Todos los preinóculos de las cepas de *C. glabrata* usadas en estos ensayos se crecieron por 36h en medio YPD a 30°C, hasta alcanzar una $OD_{600} \approx 30$. Como agente oxidante se utilizó H_2O_2 30% (w/w) de Sigma-Aldrich®. Para evaluar la sensibilidad a H_2O_2 en fase de crecimiento exponencial, los cultivos saturados fueron diluidos en medio YPD fresco, de tal forma que al término de siete duplicaciones alcanzaran una OD_{600} de 0,5 (figura 10). Inmediatamente después, los cultivos fueron divididos en alícuotas para someterse a diferentes concentraciones de H_2O_2 por 3h a 30°C y con agitación rotatoria constante. Para los experimentos de adaptación, las células se trataron por una hora con una concentración subletal de H_2O_2 y después se retaron con una dosis letal por las dos horas restantes. Al finalizar el tratamiento, se colectó la cantidad de cultivo equivalente a una OD_{600} de 0,5 y, tras la remoción del agente oxidante, las células se resuspendieron en 1mL de agua destilada estéril. Posteriormente se realizaron cinco diluciones logarítmicas en placas Costar® de 96 pozos y se gotearon 5 μ L en cajas con medio YPD.

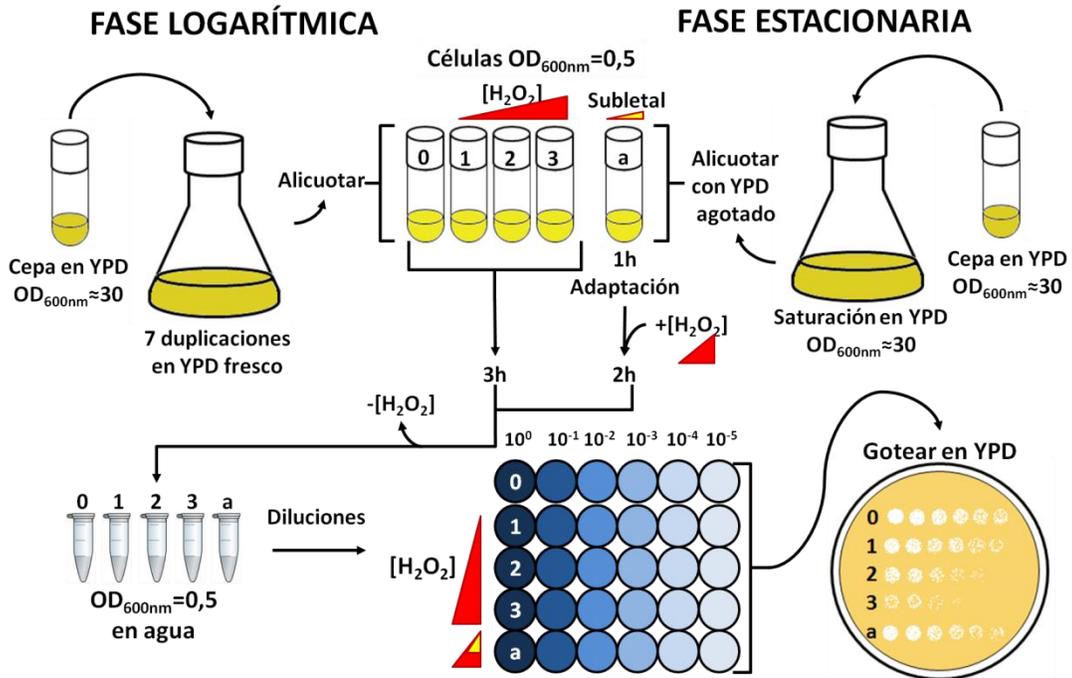


Figura 10. Representación esquemática de los ensayos de sensibilidad a H_2O_2 . Para cada cepa en los dos tipos de ensayos, las células se llevan a una OD_{600nm} de 0,5. Los tratamientos 1, 2 y 3 representan concentraciones crecientes de H_2O_2 , mientras que 0 corresponde a las células sin reto oxidante. La dosis subletal de H_2O_2 se aplica durante una hora para inducir adaptación y posteriormente se incrementa a una mayor concentración. El H_2O_2 se remueve, y 1 mL con OD_{600nm} de 0,5 se diluye logarítmicamente para gotear cada tratamiento y sus diluciones en medio YPD.

Para los ensayos de sensibilidad de células en fase estacionaria, los cultivos de una $OD_{600} \approx 30$, fueron diluidos a una OD_{600} de 0,5 con medio YPD agotado por la misma cepa (figura 10). Los cultivos fueron divididos en alícuotas para someterse a diferentes concentraciones de H_2O_2 por 3h a $30^\circ C$ y con agitación rotatoria constante. Al término del tratamiento, los cultivos permanecieron en OD_{600} de 0,5 y, tras la remoción del agente oxidante, se resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril. También se realizaron las cinco diluciones logarítmicas y se gotearon $5\mu L$ en cajas con medio YPD.

Para ambos casos, se registró el crecimiento de las cepas durante 2-3 días de incubación a $30^\circ C$. Los experimentos se realizaron al menos por duplicado.

2.7 ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A FLUCONAZOL.

Para realizar medios YPD-Fluconazol (YPD-FLC) de diferentes concentraciones, se utilizó Fluconazol 2mg/mL. Todas las cepas de *C. glabrata* usadas en este ensayo se crecieron por 36h en medio YPD a 30°C, hasta alcanzar una $OD_{600} \approx 30$. De cada cepa en fase estacionaria, se tomó la cantidad necesaria para obtener una OD_{600} de 0,5. Las células se colectaron por centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 1mL de agua estéril. Después se realizaron cinco diluciones logarítmicas seriadas en placas Costar® de 96 pozos y se gotearon 5 μ L en una caja YPD y en varias cajas YPD-F de diferentes concentraciones (ver figura 11).

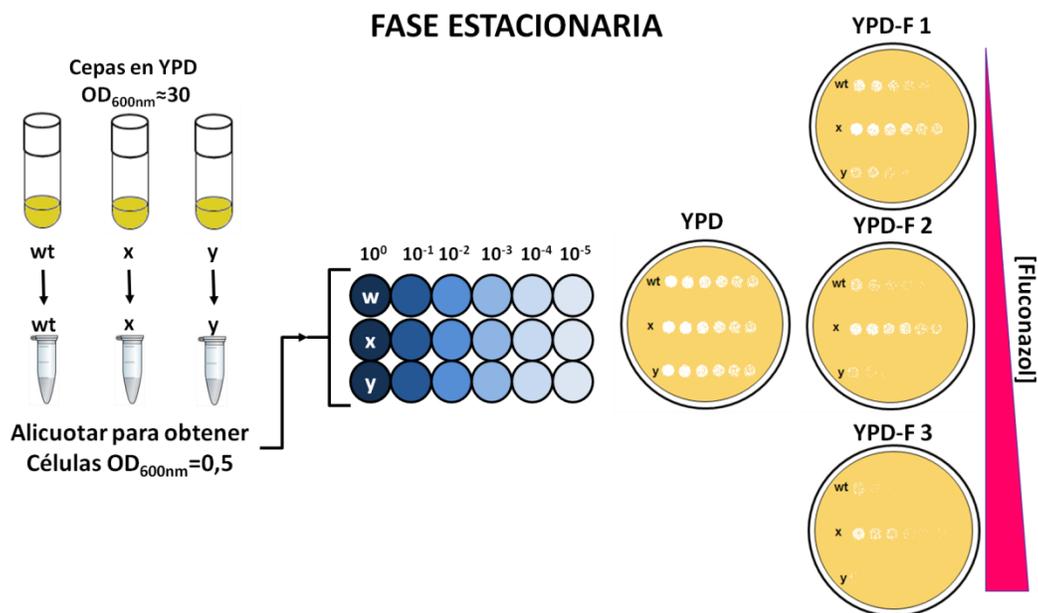


Figura 11. Representación esquemática de los ensayos de sensibilidad a fluconazol en fase estacionaria. Tres diferentes cepas (silvestre, “x” e “y”) se cultivan hasta saturación. Posteriormente se colecta la cantidad necesaria de células para obtener una OD_{600} de 0,5 y se realizan las diluciones seriadas. Posteriormente se platea en YPD y en tres diferentes concentraciones de fluconazol (1, 2 y 3). En este ejemplo, la cepa “x” es más resistente que la cepa silvestre y su vez, la cepa silvestre supera en resistencia a la cepa “y”.

Se registró el crecimiento de las cepas durante 2-3 días de incubación a 30°C.

2.8 CURVAS DE CRECIMIENTO.

Para varias cepas se determinó el comportamiento de crecimiento en medio YPD y/o CAA. Todos los preinóculos se incubaron a 30°C por 36h en YPD o en CAA hasta saturación. Después de este tiempo, se calculó la cantidad de cultivo necesario para obtener 50mL de medio fresco con una OD₆₀₀ de 0,05. Las cepas fueron incubadas a 30°C con agitación constante y se tomaron alícuotas cada hora para determinar espectrofotométricamente su densidad óptica. Los datos de OD₆₀₀ se graficaron en función del tiempo y para cada curva se tienen al menos siete puntos.

Para calcular el tiempo de duplicación de cada cepa se tomaron cinco puntos de la curva de crecimiento en fase logarítmica. Por regresión lineal se obtuvo la ecuación de la recta de primer orden [$\ln(|A_{(t)}|) = mt + b$]. Donde $\ln(|A_{(t)}|)$ corresponde al logaritmo neperiano de la absorbancia, t al tiempo, b la ordenada al origen y m la pendiente de la recta. El valor de la pendiente es directamente proporcional a la velocidad de crecimiento. El antilogaritmo de la ecuación lineal da como resultado $A_{(t)} = e^{mt} e^b$, pero a tiempo cero, $A_{(t=0)} = e^b$, por lo que la ecuación se reduce a $A_{(t)} = A_{(t=0)} e^{mt}$. El tiempo al que se obtiene el doble de la cantidad inicial ($2A_{(t=0)}$) corresponde al tiempo de duplicación ($t_d = \frac{\ln 2}{m}$).

2.9 KITS COMERCIALES.

Para aislar el ADN plasmídico de cultivos bacterianos, se usó el kit *QIAprep*. La extracción de ADN de geles de agarosa se realizó con el kit *Gel Extraction QIAquick* y el *PCR Purification QIAquick* para la purificación de productos de PCR. Todos ellos de la marca comercial QIAGEN®.

2.10 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS.

Para los análisis comparativos entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, las secuencias génicas se extrajeron de la base de datos del proyecto *Genólevures* (<http://www.genolevures.org/index.html#>) y de la base de datos de *S. cerevisiae*,

SGD (<http://www.yeastgenome.org/>). Los alineamientos y filogenias fueron hechos con el programa gratuito MEGA (<http://www.megasoftware.net/>) o BioEdit.

Los datos de los microarreglos de Biao-Ma *et al* (2009, NCBI; GEO, número de acceso: GSE6626) y Maki-Hirao *et al* (2003, <http://labs.fhcrc.org/bedalov/jbc.html>), se encuentran disponibles en línea.

2.11 TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*.

ELECTROPORACIÓN: Se utilizaron cepas electrocompetentes DH10B, DH10*pcnB* o *Stbl2* (tabla 2). La mezcla de una alícuota de células electrocompetentes con ~20-50ng del ADN a transformar, se transfirió a una celda de electroporación de 1mm (BIORAD®). Con un electroporador [Gene Pulser Xcell Electroporation System [BIORAD®]], se le aplicó un pulso eléctrico (1800V, 200mA, 50F) e inmediatamente después, las células se resuspendieron en 600µL de medio SOC para incubación con agitación a 30°C por una hora. Al término de la recuperación, se sembraron alícuotas en cajas de LB-Cb50 y se incubaron 12-24h a 30°C.

SOLUCIÓN DE ALMACENAMIENTO Y TRANSFORMACIÓN (TSS): Para la transformación de cepas bacterianas DH10*pcnB* o *Stbl2 in situ*, se utilizó la solución TSS (Chung *et al.*, 1989). La cepa a transformar se incubó a 30°C en medio LB complementado con 0,2% de glucosa hasta alcanzar una OD_{600nm} ~0,6. Se tomó 1mL de la suspensión y se mezcló perfectamente con la solución TSS y el ADN a transformar (≤250ng). Las células se incubaron en hielo media hora y se sometieron a un choque térmico a 37°C por 45s. Se colocaron nuevamente en hielo por 3min y por último se recuperaron por una hora a 30°C en medio SOC para después ser sembradas en LB-Cb50 con glucosa al 0,2%.

Las cajas se incubaron a 30°C por 12-24h. Tras la obtención de colonias aisladas se procedió con el diagnóstico de las construcciones por PCR de colonia. Una vez confirmadas, se resguardaron dos colonias independientes en glicerol al 10% a -80°C. Después se extrajeron los plásmidos mediante el kit comercial QIAprep, y se analizó su patrón de restricción con las endonucleasas

correspondientes para confirmar la presencia del inserto. Todas las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo son de New England BioLaboratories®.

2.12 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *C. glabrata*.

Las cepas de interés se cultivaron por 36h en YPD. Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en 500µL de amortiguador A [Tris 0,05M, EDTA 0,01M, NaCl 0,15M, Triton 1% (Caledon Labs.®) y SDS 1% (Fluka Biochemicals®)]. Se añadió un volumen equivalente de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico de Fluka Biochemicals® [24:24:1] y se incubó a 44°C por 30min, con agitación ocasional y vigorosa. Se recuperó la fase acuosa por centrifugación, se agregó 50µL del amortiguador A sin detergente con RNasa (AMBION®), y se incubó por 30min a 44°C. Para precipitar el ADN se añadieron 15µL de NaCl 5M y un volumen de etanol frío al 100%. El ADN se lavó con etanol al 70% y una vez seco, se resuspendió en 250µL de Tris10mM con RNasa.

2.13 PURIFICACIÓN DE ADN CON FENOL:CLOROFORMO:ALCOHOL ISOAMÍLICO Y PRECIPITACIÓN CON ETANOL.

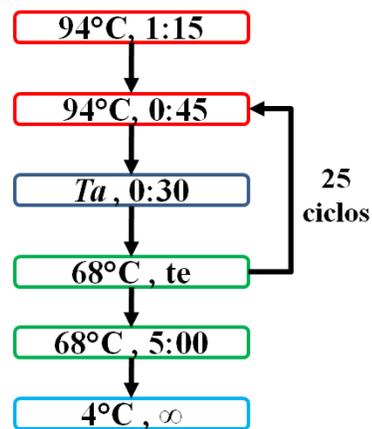
Para eliminar proteínas y sales, la muestra de ADN a purificar se llevó a un volumen final de 100µL con agua miliQ y se le añadió acetato de amonio a una concentración final de 2,5M. Se agregó un volumen equivalente de Fenol:Cloroformo:Acohol Isoamílico (24:24:1) y se agitó vigorosamente. Por centrifugación se separó la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio en donde se le adicionó 1µL de glicógeno (Roche®). Inmediatamente después se agregaron 2,5 volúmenes de etanol frío al 100% y se precipitó el ADN a -20°C por 20 min. Se concentró el ADN por centrifugación, se descartó el sobrenadante y se lavó con etanol al 70%. Se retiraron los remanentes de etanol y se aplicó calor para secar la pastilla. Finalmente el ADN se resuspendió en 20-30µL de Tris 10mM.

2.14 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la amplificación de productos nucleotídicos destinados a clonación se utilizó la ADN polimerasa *Taq* Platinum de Invitrogen®. La siguiente tabla indica las condiciones utilizadas en la reacción de PCR esquematizada a la derecha.

Reacción PCR	
Componente	Concentración final
Amortiguador 10X	1X
MgCl ₂	1,5mM
dNTPs 2mM	20µM c/u
Oligo Fw 5µM	0,25µM
Oligo Rv 5µM	0,25µM
ADN molde.	El necesario (≤500ng)
<i>Taq</i> Platinum®	1 U
H ₂ O m. Q. Estéril.	c.b.p 30µL

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROGRAMA



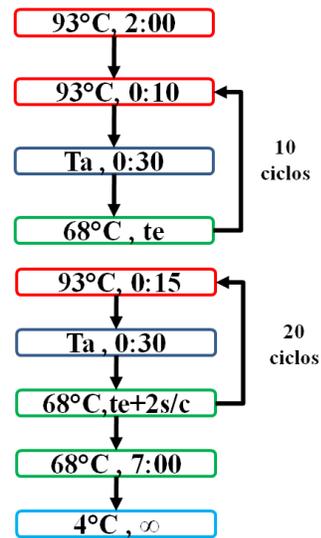
La temperatura de alineamiento (T_a) se determinó según las parejas de oligonucleótidos a utilizar y el tiempo de extensión (t_e) depende de la longitud del fragmento, teniendo en cuenta que la enzima polimeriza 1Kb/min.

Para las reacciones de diagnóstico de modificaciones genéticas, ya fueran a partir de ADN genómico o de una colonia bacteriana, se utilizó la ADN polimerasa *Taq* Amplificasa® de la UNAM. Las condiciones de reacción son semejantes a las descritas anteriormente, con la excepción de que su temperatura de extensión es de 72°C, utiliza su propio amortiguador (10X) y se usan 2,5U en 20µL de reacción. Su velocidad de polimerización se ha estimado en 1Kb/min.

Finalmente, para amplificación de fragmentos mayores a 4Kb, se utilizó la mezcla de ADN polimerasas Expand Long Template (Roche®). La siguiente tabla indica las condiciones utilizadas en la reacción de PCR esquematizada a la derecha.

Reacción PCR	
Componente	Concentración final
Amortiguador 10X	1X
con MgCl ₂ (#1, 2 o 3)	(1,75-2,75mM MgCl ₂)
dNTPs 2mM	350µM c/u
Oligo Fw 5µM	0,3µM
Oligo Rv 5µM	0,3µM
ADN molde.	El necesario (≤500ng)
Mezcla Expand Long Template [®]	0,75U
H ₂ O m. Q. Estéril.	c.b.p 30µL

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROGRAMA



El (te) depende de la longitud del fragmento, teniendo en cuenta que la enzima polimeriza 1,5Kb/min. Después de los 10 primeros ciclos, el tiempo de extensión se incrementó en 2s por cada ciclo.

La amplificación de los productos de PCR se detectó por electroforesis en geles de agarosa (0,8%) teñidos con bromuro de etidio.

2.15 CUANTIFICACIÓN DE ADN

Para cuantificar ADN en cantidades pequeñas se utilizó un método espectrofotométrico. Brevemente, en el espectrofotómetro UV-1700 PharmaSpec (SHIMADZU[®]) se colocó la celda de cuarzo TRAY CELL (HELLMA[®]) con 5µL de Tris 10mM para calibrar a cero de absorbancia a la longitud de onda de 260nm. Posteriormente se limpió con etanol 100% y una vez seca, se añadieron 5µL de la muestra de ADN. A partir de la lectura emitida a esta longitud de onda se calculó la concentración de la muestra en base a la siguiente fórmula:

$$[DNA]_{\left(\frac{ng}{\mu L}\right)} = f_{dsDNA} \times f_{cell} \times A_{\lambda 260nm}$$

Donde la concentración de la muestra está dada en ng/µL y es directamente proporcional al producto del factor de la celda (f_{cell}) con valor de 10, por el factor numérico del ADN de doble cadena (f_{dsDNA}) que es 50 y por la absorbancia de la muestra a 260nm de longitud de onda ($A_{\lambda 260nm}$).

3. RESULTADOS

3.1. GENERACIÓN DE LA CEPA MUTANTE DOBLE *sir2*Δ *hst1*Δ.

En *Candida glabrata*, la interrupción de la maquinaria del silenciamiento subtelomérico (*SIR2* o *SIR3*), resulta en un incremento en la virulencia debido a la inducción de adhesinas epiteliales normalmente silenciadas (*EPA6* y *EPA7*) (Castano *et al.*, 2005; Iraqui *et al.*, 2005). Por otra parte, como se describirá más adelante, la anulación del gen *HST1* conlleva a la activación de múltiples genes, algunos de los cuales pudieran ser relevantes en la patogenicidad de esta levadura. Es posible que la ausencia de ambas sirtuinas resulte en un incremento en la virulencia de *C. glabrata*. Por esta razón decidimos construir la cepa mutante doble *sir2*Δ *hst1*Δ.

Para construir la mutación por reemplazo génico por un sólo paso del gen *SIR2*, la cepa mutante *hst1*Δ (CGM84) se transformó con un fragmento *SacI/KpnI* derivado del pAP596. Este fragmento consiste de un casete de resistencia a higromicina ($P_{PGK1}::hph::3'UTR_{HIS3}$) flanqueado por dos secuencias homólogas a la región 5' y 3' UTR de *SIR2*. Mediante doble recombinación homóloga, *SIR2* se sustituyó por el casete de resistencia a higromicina, fenotipo con el que se seleccionaron las colonias transformantes. En las siguientes secciones de resultados, se muestran los fenotipos obtenidos para esta mutante.

3.2. Hst1p Y Sum1p REGULAN NEGATIVAMENTE LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDANTE EN FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL.

Por ensayos de sensibilidad a peróxido de hidrógeno (ver materiales y métodos, sección 2.6), confirmamos que la ausencia de *HST1* incrementa moderadamente la resistencia a estrés oxidante en fase exponencial. En comparación con la cepa silvestre, el mayor crecimiento de esta cepa mutante es evidente a concentraciones de 40 y 50mM de H₂O₂ (figura 12). Resulta interesante que la mutación del parálogo más cercano a Hst1p (*SIR2*), no comparte el fenotipo de resistencia a 50mM y por el contrario, parece un poco más sensible que a la cepa silvestre (figura 12). En futuros experimentos, la evaluación de la sensibilidad a

H₂O₂ de la cepa mutante doble *sir2Δ hst1Δ*, será útil para determinar cuál de los dos fenotipos impera en este fondo genético.

En *S. cerevisiae*, Hst1p es reclutada por el factor transcripcional Sum1p para reprimir genes de manera específica (Xie *et al.*, 1999). Recientemente, Ma. Guadalupe Gutiérrez-Escobedo, integrante de nuestro grupo de laboratorio, construyó la cepa mutante nula (*sum1Δ*) para el gen ortólogo de este represor en *C. glabrata* (CAGL0J10956). Es probable que Hst1p y Sum1p funcionen también como un complejo en esta levadura, por lo que decidimos determinar la sensibilidad a estrés oxidante de la cepa *sum1Δ*. En la figura 12, se muestra que en ausencia de Sum1p se induce resistencia a 50mM de H₂O₂ al igual que la mutante *hst1Δ*.

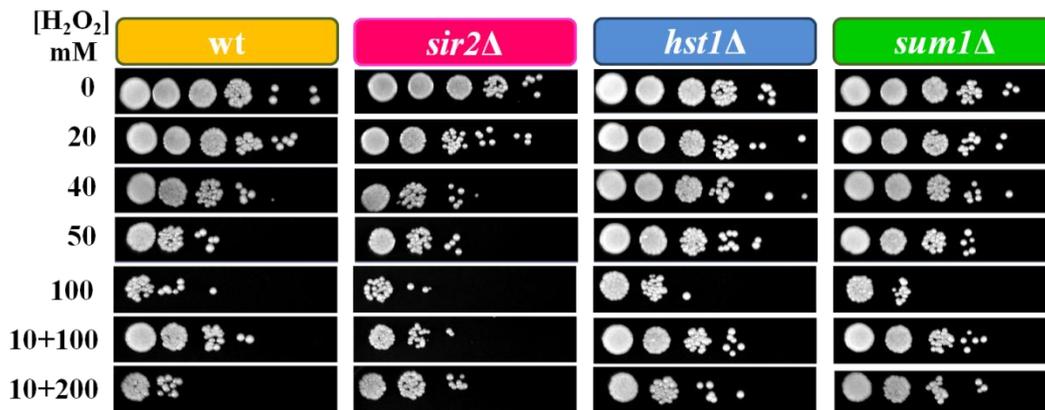


Figura 12. HST1 y SUM1 regulan negativamente la REO en fase exponencial. Se analizó la sensibilidad a H₂O₂ de la cepa silvestre (BG14), y las mutantes *sir2Δ* (CGM71), *hst1Δ* (CGM84) y *sum1Δ* (CGM673). Después de siete duplicaciones, las células en OD_{600nm}=0,5, fueron expuestas a diferentes concentraciones de H₂O₂. Al término de tres horas, se tomaron cantidades equivalentes de OD_{600nm}=0,5 y se gotearon diluciones seriadas en medio YPD. Para la adaptación, las células se trataron 1 hora con 10mM de H₂O₂ y después con 100 y 200mM por dos horas más.

Se ha sugerido que durante la adaptación a H₂O₂, *Candida glabrata* detecta y responde a niveles subletales de ERO para incrementar la expresión de genes antioxidantes y protegerse frente a subsecuentes exposiciones letales de radicales libres (Cuellar-Cruz *et al.*, 2008). En comparación con la cepa silvestre y la mutante en *SIR2*, existe una mejor respuesta adaptativa en ausencia de *SUM1* o *HST1* durante el crecimiento exponencial (figura 12). En fase estacionaria, la ausencia de *HST1* aparentemente también incrementa la resistencia a peróxido de

hidrógeno (Figura S1 en anexos), aunque éstos ensayos deberán repetirse e incluir a la cepa *sum1Δ* y la cepa mutante doble *sir2Δ hst1Δ*. Dado el nivel de variación de estos experimentos, será necesario realizar mayor número de repeticiones para confirmar la validez de nuestras observaciones. Finalmente, tenemos contemplado realizar otros ensayos de supervivencia a peróxido de hidrógeno para cuantificar las células que permanecen viables para cada cepa después de su exposición a peróxido de hidrógeno.

3.3.LA CATALASA MEDIA LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDANTE EN AUSENCIA DE Hst1p.

Está documentado que en ausencia de Hst1p, los niveles de transcrito de 235 genes son al menos dos veces y media más altos que los de la cepa silvestre en *C. glabrata* (Ma *et al.*, 2009). En la tabla 6 se presentan genes partícipes de la REO que se sobreexpresan en una cepa *hst1Δ*.

Tabla 6. Genes implicados en la REO que se sobreexpresan en la cepa <i>hst1Δ</i> .			
Gen	SE†	Comentario	Referencia
<i>UBI4</i> ‡	4,7	Ubiquitina, esencial para degradación de proteínas dañadas en condiciones de estrés oxidante.	(Watt and Piper, 1997)
<i>NCE103</i> *	4,6	Anhidrasa carbónica necesaria para crecer en condiciones aerobias y regular la concentración de HCO ₃ ⁻ intracelular.	(Gotz <i>et al.</i> , 1999)
<i>GIS1</i> ‡	4,6	Factor de transcripción que reconoce genes con el PDE. Induce la expresión de genes durante limitación de nutrientes. Necesario para reprogramar el metabolismo de carbono y respuesta a estrés en la transición a fase estacionaria.	(Wei <i>et al.</i> , 2008; Zhang <i>et al.</i> , 2009)
<i>DDR48</i> *‡	3,5	Proteína de respuesta a daño en ADN. Esencial para respuesta a estrés.	(Dib <i>et al.</i> , 2008)
<i>GPD1</i>	3,1	DL-glicerol-3-fosfatasa, involucradas en la biosíntesis del glicerol. Se inducen en respuesta O ₂ ^{•-} .	(Pahlman <i>et al.</i> , 2001)
<i>GPD2</i>	3,0		
<i>RCK2</i> *	2,9	Proteín-cinasas involucradas en la REO, participan en la cascada de Hog1 MAPK cinasas.	(Bilsland <i>et al.</i> , 2004)
<i>RCK1</i> *	2,6		
<i>SEDI</i>	2,9	Glicoproteína de pared celular con ancla GPI, inducida por diferentes estrés en fase estacionaria.	(Ezaki <i>et al.</i> , 1998)
<i>XBPI</i> *	2,8	Represor transcripcional que retrasa el ciclo celular en condiciones de estrés o falta de nutrientes.	(Liu <i>et al.</i> , 2009; Mai and Breeden, 1997)
<i>MSN4</i> ‡	2,7	Factor transcripcional de dedos de Zn, activado en condiciones de estrés. Reconoce el elemento STRE.	(Roetzer <i>et al.</i> , 2008; Schmitt and McEntee, 1996)
<i>MSN2</i>	2,5		

MGR3*	2,5	Subunidad del supercomplejo proteolítico mitocondrial i-AAA. Degrada proteínas mitocondriales mal plegadas.	(Dunn <i>et al.</i> , 2008)
CTA1*	2,0	Catalasa peroxisomal, $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$ Necesaria para la resistencia a H_2O_2 .	(Cuellar-Cruz <i>et al.</i> , 2008)

†Indica el número de veces(valor absoluto) que se encuentra sobreexpresado (SE) en relación a la cepa silvestre BG14.

*Genes inducidos por la fagocitosis de *C. glabrata* por macrófagos JM774A.1 (Kaur *et al.*, 2007).

‡Genes inducidos durante limitación de niacina en *C. glabrata* (Ma *et al.*, 2009)

Estudios anteriores determinaron que la eficiente respuesta antioxidante de *C. glabrata* depende de la catalasa (*CTA1*) ya que sin esta metaloenzima, la célula se torna hipersensible a H_2O_2 (Canas-Villamar, 2007; Cuellar-Cruz *et al.*, 2008). En ausencia de *HST1*, el gen de la catalasa se induce moderadamente (tabla 6). La figura 13 muestra que el fenotipo sensible de la cepa *cta1Δ* no puede suprimirse con la inducción de la respuesta antioxidante que se deriva por la falta de Hst1p, ya que una cepa mutante doble es incluso más sensible que la cepa sin catalasa. Sin embargo, *C. glabrata* aún sin catalasa es capaz de adaptarse mejor que la mutante doble (figura 13, fila 5). Es posible que la pérdida de Hst1p, conlleve a otros efectos celulares que por falta de la catalasa comprometan su adaptación y respuesta a estrés oxidante.

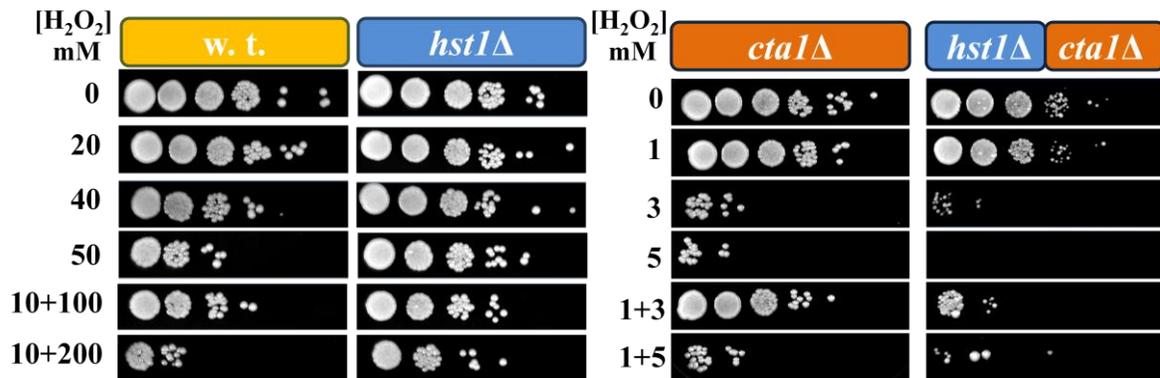


Figura 13. El incremento en la resistencia a H_2O_2 en *hst1Δ* es mediado por la catalasa. Se analizó la sensibilidad a H_2O_2 de la cepa silvestre (BG14), la mutante *hst1Δ* (CGM84), *cta1Δ* (CGM295) y la doble mutante *hst1Δcta1Δ* (CGM323) en fase logarítmica. Después de siete duplicaciones, las células en $OD_{600nm}=0,5$, fueron expuestas a diferentes concentraciones de H_2O_2 y tres horas después se gotearon en medio YPD. Para la adaptación, las células se trataron con una dosis baja por una hora y dos horas después se sometieron a dosis letales.

3.4. MUTACIONES EN *HST1* O *SUM1* INCREMENTAN EL TIEMPO DE DUPLICACIÓN EN FASE LOGARÍTMICA.

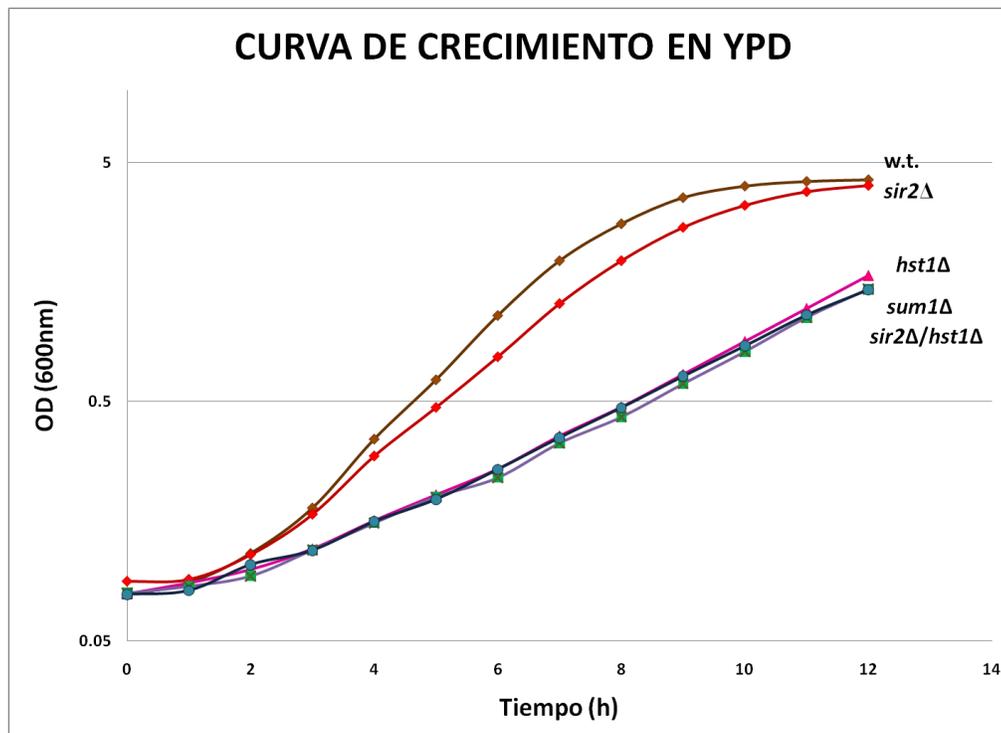
En *Candida glabrata*, otro de los fenotipos atribuidos a la mutación de *HST1* es la disminución en la velocidad de crecimiento en medio rico (YPD). Hasta el momento no se ha reportado que la mutación del ortólogo a *HST1* de *S. cerevisiae* afecte el ciclo celular, pero en la tabla 7 se enlistan los genes que están sujetos a regulación negativa por *HST1* de *C. glabrata* y cuya sobreexpresión se ha vinculado a un retraso en el crecimiento en *S. cerevisiae*.

Tabla 7. Genes controlados negativamente por CgHst1p y que al sobreexpresarse afectan el crecimiento en *S. cerevisiae*

Gen	SE	Comentario	Referencia
<i>RGMI</i>	2,9	Posible represor transcripcional de dedos de zinc.	(Estruch, 1991)
<i>PPZ1*</i>	2,9	Serín/treonin fosfatasas tipo Z. Involucradas en el transporte de K ⁺ . Su sobreexpresión, afecta la estabilidad osmótica y la progresión del ciclo celular. Causa arresto en G2/M.	(Niu <i>et al.</i> , 2008; Yenush <i>et al.</i> , 2002)
<i>PPZ2</i>	2,9	Proteína de función desconocida con motivos de dedos de zinc. La sobreexpresión causa arresto celular en G2/M .	(Niu <i>et al.</i> , 2008)

*Genes inducidos por la fagocitosis de *C. glabrata* por macrófagos JM774A.1 (Kaur *et al.*, 2007).

Por medio de curvas de crecimiento, calculamos el tiempo de duplicación de la cepa silvestre, *hst1Δ*, *sum1Δ* y la doble mutante *hst1Δ sir2Δ*. Encontramos que en ausencia del factor transcripcional Sum1p o de la desacetilasa Hst1p, *C. glabrata* exhibe un pronunciado retraso en el crecimiento exponencial (figura 14). En comparación con la cepa silvestre cuya duplicación es cada 70 minutos, los tiempos de duplicación se extienden hasta 155min en ausencia de *HST1* y de 165min para la mutante en *SUM1*. También fue posible detectar un sutil descenso en la velocidad de crecimiento cuando la desacetilasa Sir2p está ausente, aunque el tiempo de duplicación sólo se extiende trece minutos más que en la cepa silvestre. La doble mutante que carece de ambas sirtuinas, exhibe un tiempo de duplicación similar a la mutante en *HST1*.



Parámetro	BG14	CGM71	CGM84	CGM673	CGM712
	wt	<i>sir2Δ</i>	<i>hst1Δ</i>	<i>sum1Δ</i>	<i>sir2Δ hst1Δ</i>
m	0.5945	0.5009	0.3168	0.3103	0.2863
b	-3.4631	-3.2567	-3.2795	-3.3172	-3.0298
r	0.9987	0.9992	1.0000	0.9992	0.9985
td	01:10	01:23	02:11	02:14	02:25

Figura 14. En ausencia de *SUM1* y *HST1*, el tiempo de duplicación se extiende 2,2 veces más en medio YPD. Se colectaron muestras cada 60 minutos por 12 horas para la cepa silvestre (BG14) y las mutantes; *sir2Δ* (CGM71), *hst1Δ* (CGM84), *sum1Δ* (CGM673) y *sir2Δ hst1Δ* (CGM712); y se graficó el valor de la OD_{600nm} en función del tiempo. Se tomaron los valores logarítmicos de de cinco puntos de la gráfica y por regresión lineal se obtuvo el valor de la pendiente. Para obtener los tiempos de duplicación, el logaritmo natural de 2 se dividió entre la pendiente.

3.5. LA RESISTENCIA A FLUCONAZOL SE INCREMENTA EN AUSENCIA DE *HST1* O *SUM1*.

La resistencia innata de *C. glabrata* hacia los fármacos azólicos, dificulta el tratamiento de los pacientes infectados por esta levadura y resulta en un incremento en el índice de mortalidad de las candidemias. Es importante mencionar que el análisis del microarreglo de la cepa de *C. glabrata* sin Hst1p (Ma

et al., 2009), revela que en ausencia de esta sirtuina se inducen fuertemente algunos genes de transportadores que se asocian a mecanismos de resistencia pleiotrópica farmacológica. Principalmente se refieren a genes de transportadores ABC y de la superfamilia facilitadora principal (MFS).

Tabla 8. Genes que confieren resistencia a fluconazol y se inducen en la cepa <i>hst1Δ</i> .			
Gen	SE	Comentario	Referencia
<i>CDR1</i>	21,2	Principal transportador del tipo ABC, expulsa diversos xenobióticos mediante la hidrólisis de ATP. Confiere resistencia pleiotrópica a fármacos (PDR). Sobreexpresado en aislados clínicos de <i>C. glabrata</i> .	(Bennett <i>et al.</i> , 2004; Sanglard <i>et al.</i> , 2001; Wada <i>et al.</i> , 2005)
<i>YBT1</i>	14,0	Transportador del tipo ABC. Transporta bilis y taurocolato.	(Ortiz <i>et al.</i> , 1997)
<i>AUS1</i>	3,7	Transportador del tipo ABC. Involucrado en la incorporación de esteroides y crecimiento anaerobio. Protege frente a fluconazol en <i>C. glabrata</i> .	(Nakayama <i>et al.</i> , 2007)
<i>YOR1</i>	3,5	Transportador del tipo ABC. Confiere PDR. Involucrado en la desintoxicación de cadmio en <i>S. cerevisiae</i> .	(Nagy <i>et al.</i> , 2006)
<i>ATRI</i>‡	3,3	Bomba de expulsión de multifármacos de la MFS. Confiere resistencia a aminotriazol.	(Kanazawa <i>et al.</i> , 1988)
<i>FLR1</i>	3,0	Transportador de multifármacos de la MFS. En <i>S. cerevisiae</i> la transcripción depende de Yap1p.	(Alarco <i>et al.</i> , 1997; Teixeira <i>et al.</i> , 2008)
<i>QDR2</i>‡	3,0	Transportador tipo MFS, confiere resistencia a quinidina. Posiblemente participe en la incorporación de K ⁺ .	(Vargas <i>et al.</i> , 2007)
<i>PDR1</i>	2,9	Factor transcripcional maestro de núcleo de zinc [Zn(2)-Cys(6)]. Reconoce el elemento PDRE y regula finamente los genes de respuesta a multifármacos. Aislados clínicos de <i>C. glabrata</i> presentan mutaciones de ganancia de función en este factor e incrementan su resistencia.	(Ferrari <i>et al.</i> , 2009; Tsai <i>et al.</i> , 2006; Vermitsky <i>et al.</i> , 2006)
<i>PDR12</i>	2,7	Transportador del tipo ABC, regulado positivamente por War1p. Involucrado en resistencia a ácidos orgánicos débiles.	(Gregori <i>et al.</i> , 2007; Piper <i>et al.</i> , 1998)
<i>PDH1</i>*	2,5	Transportador del tipo ABC, ortólogo de <i>CDR1</i> . Confiere resistencia pleiotrópica a fármacos (PDR). Sobreexpresado en aislados clínicos de <i>C. glabrata</i> .	(Bennett <i>et al.</i> , 2004; Izumikawa <i>et al.</i> , 2003)

*Genes inducidos por la fagocitosis de *C. glabrata* por macrófagos JM774A.1 (Kaur *et al.*, 2007).

‡Genes inducidos durante limitación de niacina en *C. glabrata* (Ma *et al.*, 2009)

Hasta el momento, no se ha documentado la existencia de un mecanismo de control epigenético sobre los genes que codifican para dichos transportadores. Es por ello que decidimos analizar la sensibilidad a fluconazol de varias cepas mutantes de *C. glabrata* (materiales y métodos sección 2.7).

Los ensayos revelaron que el crecimiento de la cepa silvestre y mutante en *SIR2*, disminuye significativamente a partir de 16µg/mL de fluconazol (FLC16), lo

cual indica que la ausencia de Sir2p no confiere resistencia al fungistático. Sorprendentemente, las mutantes *hst1Δ*, *sum1Δ* y la doble mutante *hst1Δsir2Δ* son capaces crecer a concentraciones tan elevadas como 128 μg/mL (figura 15). Estos resultados sugieren que Sum1p y Hst1p regulan negativamente genes que confieren resistencia a este fármaco azólico.

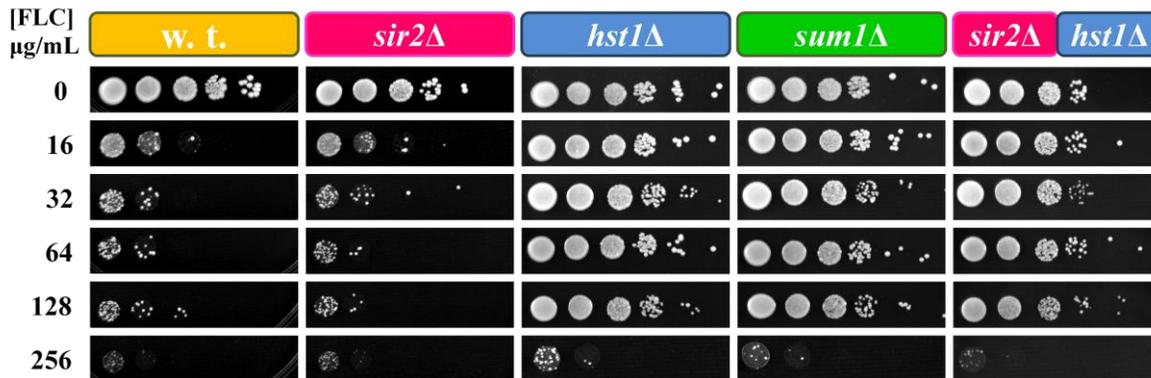


Figura 15. Hst1p y Sum1p, ejercen un control negativo sobre genes de resistencia a fluconazol en fase estacionaria. La cepa silvestre (BG14), y las mutantes *sir2Δ* (CGM71), *hst1Δ* (CGM84), *sum1Δ* (CGM673) y *sir2Δhst1Δ* (CGM712) se incubaron por 36h en medio YPD hasta saturación. De cada una de las cepas se tomó la cantidad necesaria para obtener células en $OD_{600nm}=0,5$, se realizaron diluciones y se gotearon en medios con diferentes concentraciones de fluconazol (16, 32, 64, 128 y 256 μg/mL).

La desacetilasa Hst1p de *C. glabrata*, probablemente junto al factor Sum1p, reprime la expresión de transportadores para precursores del cofactor NAD^+ , permeasas de aminoácidos y hexosas, así como genes relacionados con la respuesta a estrés o con resistencia a fluconazol (Ma *et al.*, 2009). Tal parece que la inducción de los genes controlados negativamente por Hst1p en *C. glabrata*, posiblemente favorezca la supervivencia y adaptación del patógeno al estrés que enfrenta en el hospedero. Sin embargo, la interacción física entre Hst1p y los genes que regula negativamente debe ser comprobada. Con esta finalidad decidimos fusionar traduccionalmente a *HST1* con el epítipo *c-myc13*. De esta forma con anticuerpos monoclonales dirigidos contra c-Myc y mediante el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), podremos identificar las secuencias que estén enriquecidas para esta sirtuina. También, decidimos marcar a *HST1* con la proteína verde fluorescente para determinar su localización sub-

celular bajo diferentes estímulos (fluconazol, limitación de niacina, estrés oxidante).

3.6. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PARA EL MARCAJE CON EPÍTOPOS.

El marcaje con epítomos, es un método de ADN recombinante que fusiona en fase la secuencia de un gen de interés con un polinucleótido corto que codifica para un epítomo. El uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el epítomo permite localizar y purificar prácticamente cualquier proteína, así como detectar sus interacciones con otros polipéptidos o secuencias génicas (Jarvik and Telmer, 1998).

Varios integrantes del laboratorio conjuntamos esfuerzos para construir vectores que permiten la marcación de proteínas en su extremo C-terminal. La estrategia permite construir proteínas quiméricas y a la vez seleccionar eficientemente las colonias transformantes que incorporan dicha modificación en el genoma. En este trabajo los epítomos se obtuvieron de vectores con los productos de PCR de la proteína verde fluorescente (*GFP*) y *c-Myc13* (proteína nuclear asociada a tumores humanos).

Generalmente las proteínas toleran más frecuentemente adiciones polipéptidicas en sus extremos terminales que en la secuencia central, probablemente porque el sitio activo no suele encontrarse en dichas regiones del polipéptido. Sin embargo, existen excepciones en donde la actividad enzimática es dependiente de la integridad de alguno de los extremos terminales (Jarvik and Telmer, 1998). Los vectores aquí descritos se diseñaron para que el epítomo se añadiera al extremo C-terminal porque de esta forma se asegura que sólo las proteínas quiméricas completamente sintetizadas serán las que se detecten.

En este trabajo se construyó el vector intermediario (pOZ14) que permite la incorporación de diversos epítomos. Del pOZ14, se obtuvo un plásmido con *c-Myc13* (pOZ18) y otro con *GFP* (pOZ16), y ya se tienen también los vectores con el epítomo *HA* (hemaglutinina) y *FLAG* (sitio activo de la enterocinasa). La figura 16 muestra la estrategia seguida para la obtención de dichos plásmidos.

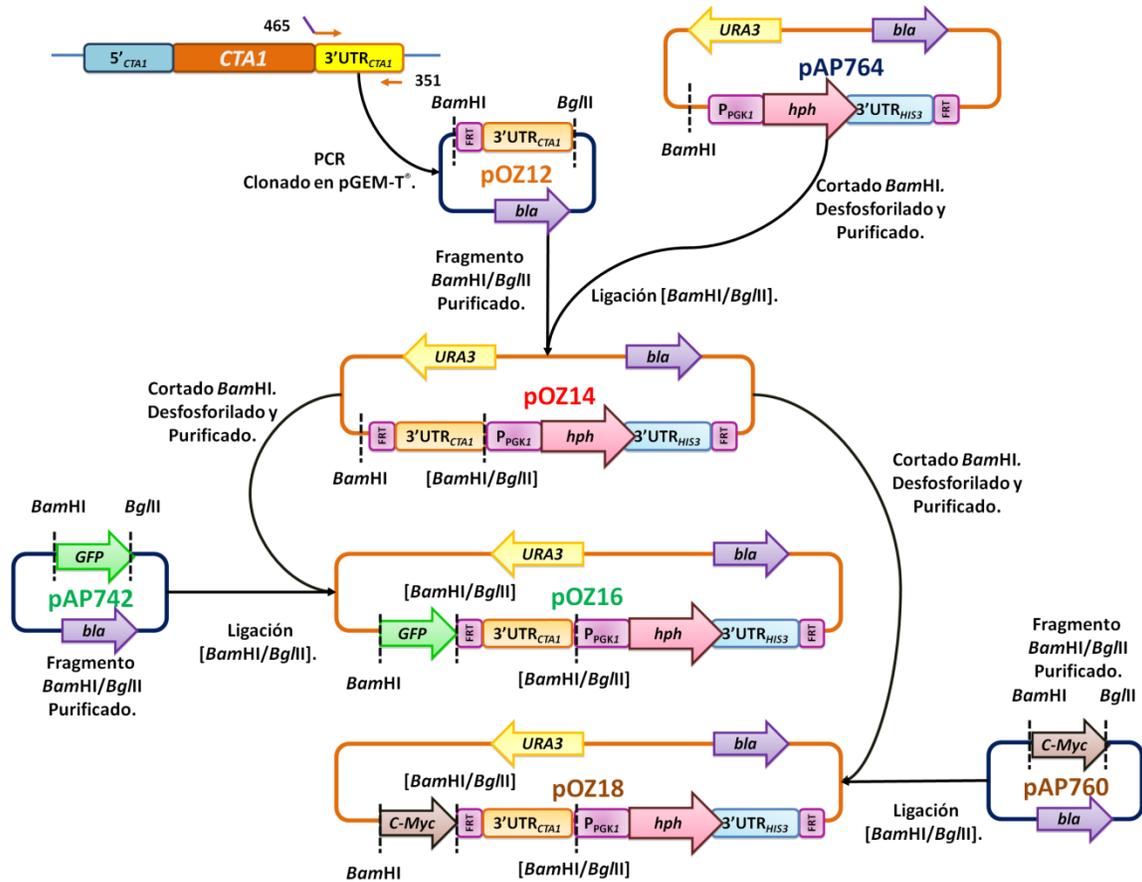
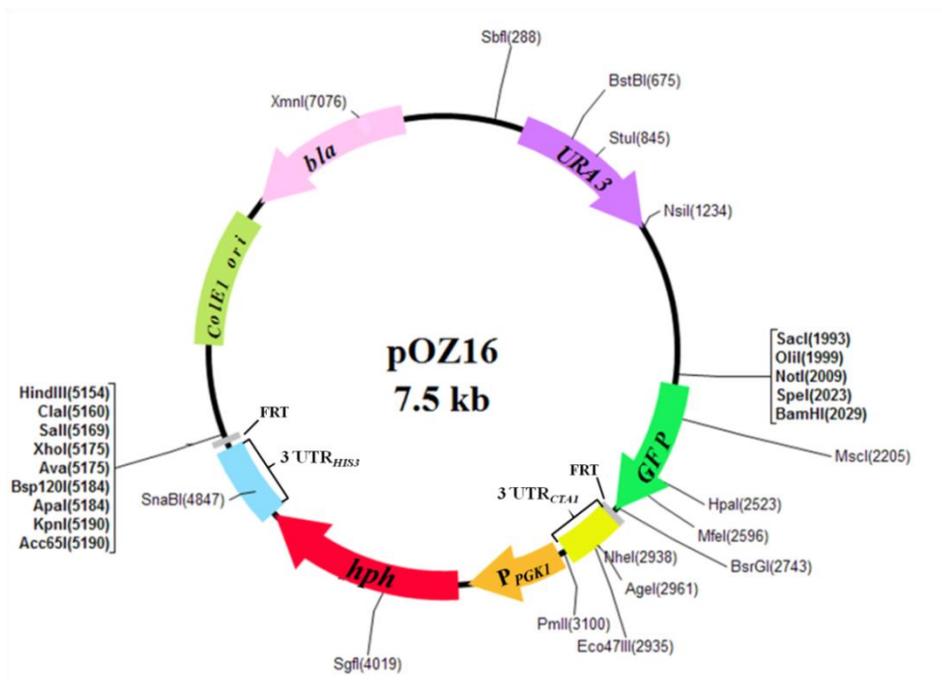


Figura 16. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos con los epítotos *GFP* (pOZ16) y *c-Myc13* (pOZ18). Mediante PCR se sintetizó el terminador funcional de la catalasa con un sitio *FRT* al 5' (0,341Kb) y se resguardó en pGEM-T[®] (pOZ12). El plásmido se extrajo de *E. coli*, se cortó con *Bam*HI/*Bg*II y se purificó el fragmento correspondiente al terminador a partir de un gel de agarosa (0,8%). El plásmido pAP764; con el gen de resistencia a higromicina (*hph*) colocado bajo la dirección del promotor de *PGK1* y el terminador de *HIS3* con un sitio *FRT*; se cortó con *Bam*HI y se desfosforiló con la fosfatasa intestinal de ternera (CIP). Las secuencias *Bam*HI y *Bg*II, poseen extremos cohesivos compatibles pero no regeneran ninguno de los dos sitios tras su ligación. El terminador de la catalasa se clonó en pAP764 a través de la ligación *Bam*HI/*Bg*III (pOZ14). Las secuencias de *GFP* y *c-Myc13* se obtuvieron de pAP742 y pAP760, respectivamente. Los epítotos digeridos con *Bam*HI/*Bg*II se purificaron y se clonaron en pOZ14 digerido con *Bam*HI y desfosforilado para dar lugar a pOZ16 y pOZ18. Cada paso de clonación se verificó por PCR y con enzimas de restricción.

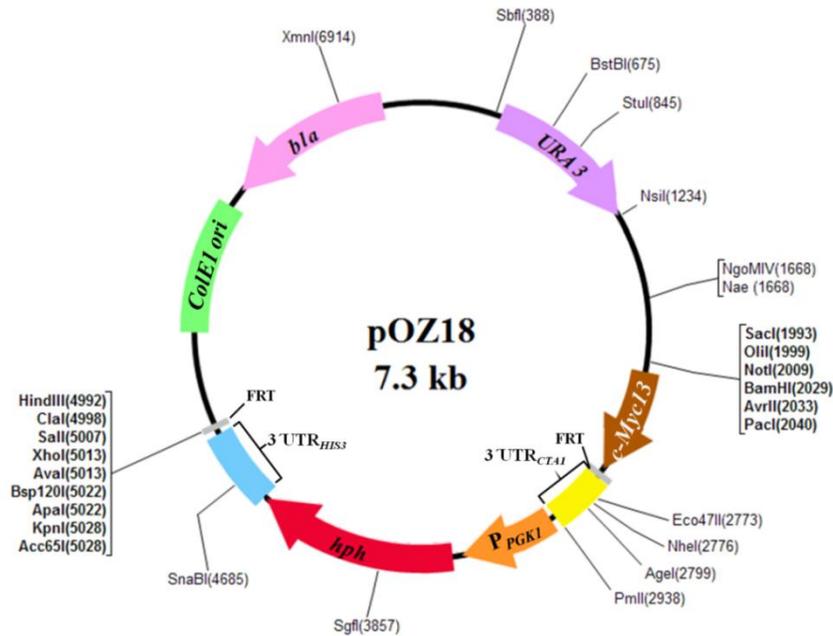
Las características y diagramas de los plásmidos pOZ16 y pOZ18, se ilustran en la figura 17 y 18, respectivamente.



Mapa pOZ16

Secuencia	Coordenadas (#pb)	Comentario
▶ <i>URA3</i>	411-1214 (804pb)	Gen que codifica para la orotidina 5'-fosfato descarboxilasa. Participa en la biosíntesis <i>de novo</i> de pirimidinas en <i>S. cerevisiae</i> . Marcador de selección que complementa la auxotrofia por uracilo.
▶ <i>GFP</i>	2037-2753 (717pb)	Proteína verde fluorescente mutante 3 de <i>Aequoria victoria</i> . Contiene mutaciones S65G y S72A cerca del cromóforo. Optimizada para <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i> . (fluorescente a $\lambda=488\text{nm}$.)
■ 3'UTR _{CTAI}	2760-3082 (323pb)	Terminador de la catalasa de <i>C. glabrata</i> (CTAI). Funciona como terminador temporal de la fusión traduccional. Posee un sitio <i>FRT</i> río arriba de la secuencia.
▶ P _{PGK1}	3117-3609 (493pb)	Promotor constitutivo de la 3-fosfoglicerato cinasa en <i>S. cerevisiae</i> . Es fuertemente inducido en glucosa como fuente de carbono.
▶ <i>hph</i>	3656-4684 (1029pb)	Higromicina fosfotransferasa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Cinasa que inactiva el antibiótico higromicina B por fosforilación. Marcador de selección que confiere resistencia a higromicina B.
■ 3'UTR _{HIS3}	4695-5095 (401pb)	Terminador funcional de la imidazolglicerol-fosfato dehidratasa. Es flanqueado por un sitio <i>FRT</i> río abajo de la secuencia.
■ <i>FRT</i>	[2760-2793, (34pb)] [5120-5153, (34pb)]	Secuencias de reconocimiento de recombinasa <i>FLP</i> (<i>S. cerevisiae</i>). <i>FLP</i> crea rompimientos de doble cadena en dos secuencias <i>FRT</i> repetidas directas y después las une en los extremos. El proceso elimina el ADN encontrado entre las secuencias <i>FRT</i> .
■ <i>ColE1 ori</i>	5631-6313 (683pb)	Origen de replicación unidireccional de <i>E. coli</i> . Al carecer del gen <i>ROP</i> es bajo número de copias (10-30/célula)
◀ <i>bla</i>	6408-7268 (861pb)	β -lactamasa derivada de <i>E. coli</i> . Marcador de selección bacteriano. Degrada β -lactámicos y confiere resistencia a carbenicilina.

Figura 17. Representación esquemática del pOZ16 (GFP). En el vector se indican las secuencias de la tabla y los sitios de restricción en negritas indican los sitios múltiples de clonación (MCS).



Mapa pOZ18

Secuencia	Coordenadas (#pb)	Comentario
▶ <i>URA3</i>	411-1214 (804pb)	Gen que codifica para la orotidina 5'-fosfato descarboxilasa. Participa en la biosíntesis <i>de novo</i> de pirimidinas en <i>S. cerevisiae</i> . Marcador de selección que complementa la auxotrofia por uracilo.
▶ <i>c-Myc13</i>	2037-2579 (543pb)	Epítipo de trece repeticiones del decapeptido EQKLISEEDL. Proviene de los aminoácidos 410-419 de la proteína humana c-myc. Reconocido por el anticuerpo monoclonal de ratón Anti-c-myc (9E10).
■ 3'UTR _{CTAI}	2598-2920 (323pb)	Terminador de la catalasa de <i>C. glabrata</i> (<i>CTAI</i>). Funciona como terminador temporal de la fusión traduccional. Posee un sitio <i>FRT</i> río arriba de la secuencia.
▶ P _{PGK1}	2955-3447 (493pb)	Promotor constitutivo de la 3-fosfoglicerato cinasa en <i>S. cerevisiae</i> . Es fuertemente inducido en glucosa como fuente de carbono.
▶ <i>hph</i>	3494-4522 (1029pb)	Higromicina fosfotransferasa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Cinasa que inactiva el antibiótico higromicina B por fosforilación. Marcador de selección que confiere resistencia a higromicina B.
■ 3'UTR _{HIS3}	4533-4933 (401pb)	Terminador funcional de la imidazolglicerol-fosfato dehidratasa. Es flanqueado por un sitio <i>FRT</i> río abajo de la secuencia.
■ <i>FRT</i>	[2598-2631, (34pb)] [4958-4991, (34pb)]	Secuencias de reconocimiento de recombinasa <i>FLP</i> (<i>S. cerevisiae</i>). <i>FLP</i> crea rompimientos de doble cadena en dos secuencias <i>FRT</i> repetidas directas y después las une en los extremos. El proceso elimina el ADN encontrado entre las secuencias <i>FRT</i> .
■ <i>ColE1 ori</i>	5631-6313 (683pb)	Origen de replicación unidireccional de <i>E. coli</i> . Al carecer del gen <i>ROP</i> es bajo número de copias (10-30/célula)
▶ <i>bla</i>	6408-7268 (861pb)	β-lactamasa derivada de <i>E. coli</i> . Marcador de selección bacteriano. Degrada β-lactámicos y confiere resistencia a carbenicilina.

Figura 18. Representación esquemática del pOZ18 (*c-Myc13*). En el vector se indican las secuencias de la tabla y los sitios de restricción en negritas indican el sitio múltiple de clonación (MCS).

Con el uso de estos vectores se puede marcar cualquier proteína y seleccionar fácilmente las colonias transformantes. Más adelante se describirá el

procedimiento seguido para la marcación de Hst1p con ambos epítomos, pero que ejemplifica el protocolo que puede seguirse para el marcaje de cualquier gen.

3.7. LAS CEPAS *hst1Δ* Y *sum1Δ* PIERDEN EL FENOTIPO DE LENTO CRECIMIENTO EN EL MEDIO CASAMINOÁCIDOS.

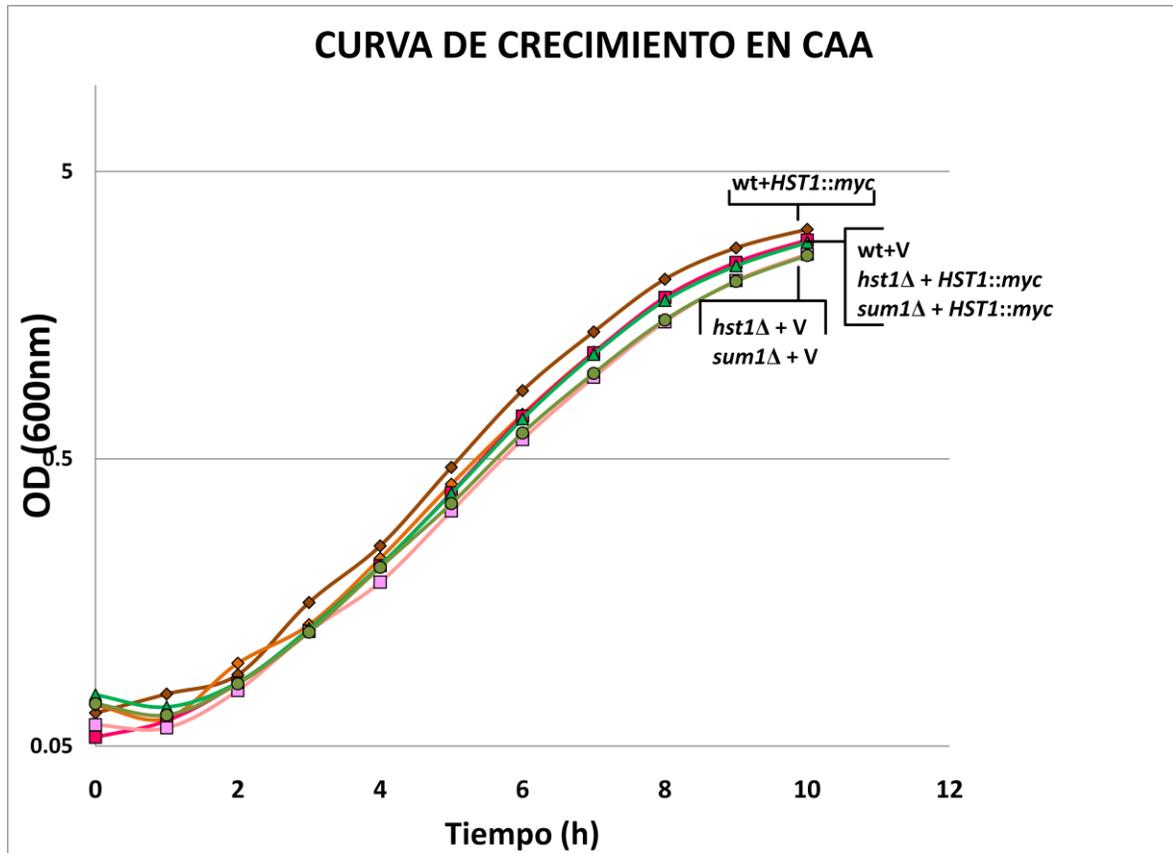
Cuando las proteínas son marcadas con epítomos, se realiza la prueba genética clásica de complementación para evaluar la funcionalidad de la proteína quimérica. Si el gen que codifica para la fusión traduccional, restaura el fenotipo silvestre de una cepa mutante nula o termosensible para dicho gen, entonces la quimera es funcional.

Antes de integrar al genoma las fusiones traduccionales de la sirtuina con los epítomos, decidimos evaluar la complementación en la mutante *hst1Δ*, usando un plásmido replicativo que contiene este gen fusionado con *c-Myc13*.

El plásmido pOZ40 contiene la fusión de *HST1::c-Myc13*, una secuencia *CEN/ARS* de *C. glabrata* y *URA3* como marcador de selección. El gen quimérico se conforma de 0,381Kb de la región promotora de *HST1*, seguido del ORF fusionado a *c-Myc13* y 0,526Kb del terminador (3'UTR). El pOZ40 y el vector vacío (pGRB2.0), se utilizaron para transformar a la cepa silvestre y a las mutantes *hst1Δ* y *sum1Δ*. Las transformantes se seleccionaron en medio sin uracilo (CAA).

Mediante curvas de crecimiento, caracterizamos los tiempos de duplicación de las cepas transformadas con la fusión (pOZ40) y los comparamos contra las cepas con el vector vacío (pGRB2.0). La retención de los plásmidos replicativos, sólo se logra mediante la selección en medio sin uracilo, es por ello que las curvas se realizaron en el medio CAA. En el medio rico (YPD), los tiempos de duplicación de las cepas mutantes en *HST1* o *SUM1* se extienden más de dos veces en comparación con la cepa silvestre. Teóricamente sólo con una proteína quimérica funcional, la velocidad de crecimiento de la cepa mutante *hst1Δ* sería restaurada.

Sin embargo, los tiempos de duplicación para las mutantes *sum1Δ* y *hst1Δ*, fueron semejantes al de la cepa silvestre, tanto con la construcción (pOZ40) como con el vector vacío (figura 19).

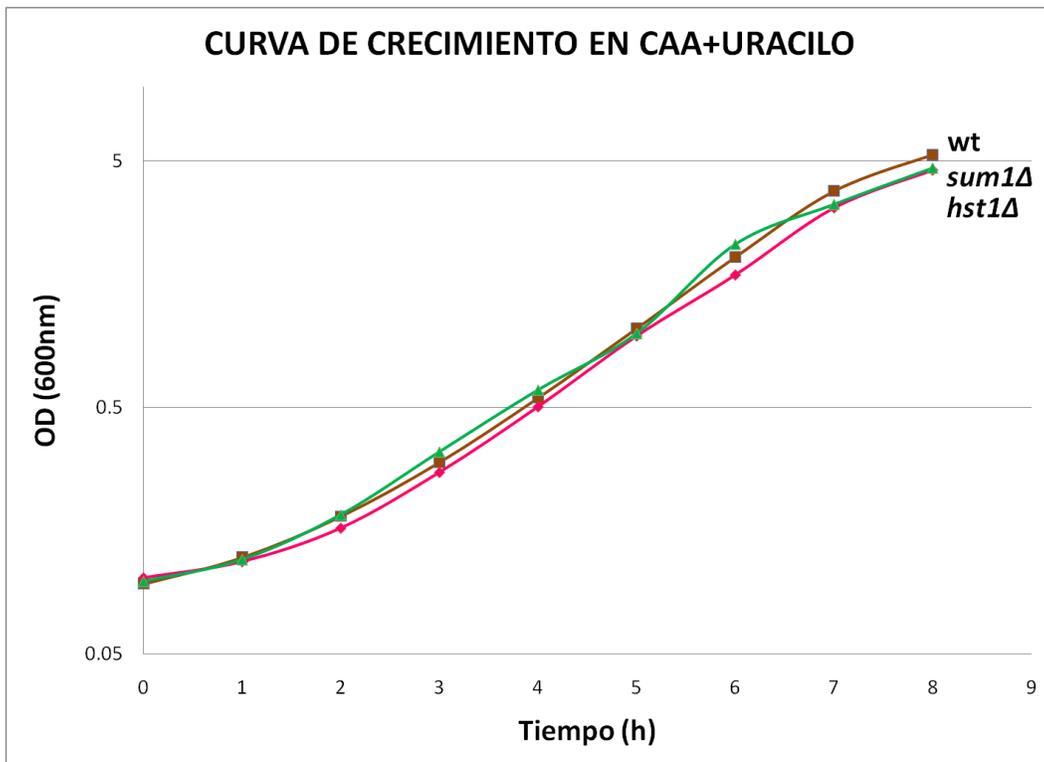


Parámetro	wt		<i>hst1Δ</i>		<i>sum1Δ</i>	
	CGM718	CGM518	CGM728	CGM730	CGM736	CGM738
	pOZ40	pGRB2.0	pOZ40	pGRB2.0	pOZ40	pGRB2.0
m	0.5583	0.5523	0.5662	0.5221	0.5574	0.5224
b	-3.5554	-3.6787	-3.7869	-3.7001	-3.7475	-3.6496
r	0.9967	0.9992	0.9991	0.9965	0.9993	0.9995
td (h:min)	1:14	1:15	1:13	1:20	1:14	1:20

Figura 19. Las cepas mutantes *hst1Δ* o *sum1Δ* con o sin la fusión *HST1::c-Myc13*, se replican a la misma velocidad que la cepa silvestre en el medio CAA. La cepa silvestre CGM718, la mutante *hst1Δ* CGM728 y la mutante *sum1Δ* CGM736 contienen la construcción replicativa de *HST1::c-Myc13*, (pOZ40), mientras que wt+V (CGM744), *hst1Δ*+V (CGM730) y *sum1Δ*+V (CGM738) contienen el vector vacío (pGRB2.0).

Decidimos explorar el fenotipo de las cepas parentales en medio CAA complementado con uracilo, para descartar la posibilidad de que el vector replicativo fuera el responsable de éste comportamiento. Resulta interesante que

las cepas mutantes parentales (*sum1Δ* y *hst1Δ*) carecen del fenotipo de lento crecimiento en el medio CAA (figura 20).



Parámetro	BG14	CGM84	CGM673
	wt	<i>hst1Δ</i>	<i>sum1Δ</i>
m	0.6393	0.6185	0.5995
b	-3.1411	-3.1528	-2.9165
r2	0.9997	0.9996	0.9902
td (h:min)	01:15	01:07	01:10

Figura 20. Las mutantes *hst1Δ* y *sum1Δ* no presentan un fenotipo de lento crecimiento en el medio CAA. Se graficó la densidad óptica de las cepas en función de tiempo. En contraste con el fenotipo de lento crecimiento visto para ambas mutantes en YPD, la mutante *hst1Δ* (CGM84) y la mutante *sum1Δ* (CGM673), exhiben un comportamiento casi idéntico a la cepa silvestre (BG14) en este medio (suplementado solamente con uracilo para complementar la auxotrofia de las parentales).

Esta observación puede deberse a dos posibilidades; que exista algún componente en el medio CAA que restaure la velocidad de replicación o bien que en el medio YPD algún otro componente la inhiba. De cualquier forma, otros

experimentos deberán ser llevados a cabo para determinar la causa del comportamiento diferencial de éstas mutantes en estos medios. Además, la funcionalidad de la proteína quimérica (Hst1::c-Myc13p) deberá ser evaluada mediante la complementación de otro fenotipo, como la sensibilidad a fluconazol, que es la consecuencia más clara de la ausencia de *HST1*

3.8. FUSIÓN DE *HST1* CON *GFP* Y *c-Myc13*.

Para fusionar traduccionalmente a *HST1* en el C-terminal con los epítomos, se sintetizó por PCR el fragmento terminal del ORF sin codón de paro y parte de la región 3'UTR. Las recomendaciones siguientes se refieren al diseño de los oligonucleótidos para amplificar cada fragmento.

Segmento terminal del ORF (3'ORF).

- *Oligonucleótido sentido*: Es preferible que se diseñe con un sitio de restricción nativo del gen a marcar, compatible con el MCS del vector.
- *Oligonucleótido reverso*: Debe hibridar al final del ORF y excluir el codón de paro. Se recomienda que tenga el sitio de restricción *Bgl*II más una timina (**a[^]gatct-t**). Así, al cortar el inserto con dicha enzima y el vector con *Bam*HI (**g[^]gatcc**), la ligación de los extremos compatibles no regeneran ninguno de los sitios usados [**agatcc**], pero mantiene a la proteína y al epítipo en la misma fase, con la adición de sólo tres aminoácidos (**KIL**).

Terminador (3'UTR).

- *Oligonucleótido sentido*: Hibrida inmediatamente después del codón de paro y posee un sitio de restricción compatible con el MCS del vector.
- *Oligonucleótido reverso*: Se recomienda que posea un sitio de restricción nativo del gen a marcar y que además sea compatible con el MCS del vector.

Preferentemente, las secuencias deben ser ≈1Kb para favorecer los eventos de recombinación homóloga.

Los fragmentos y vectores se cortaron con las enzimas de restricción indicadas, se purificaron de gel y se clonaron secuencialmente (figura 21). El orden de la clonación se determina con base en los sitios únicos de restricción que

permanecen disponibles después de la adición de un inserto. Es importante elegir oportunamente los sitios de restricción que incorporan los oligonucleótidos para facilitar este proceso.

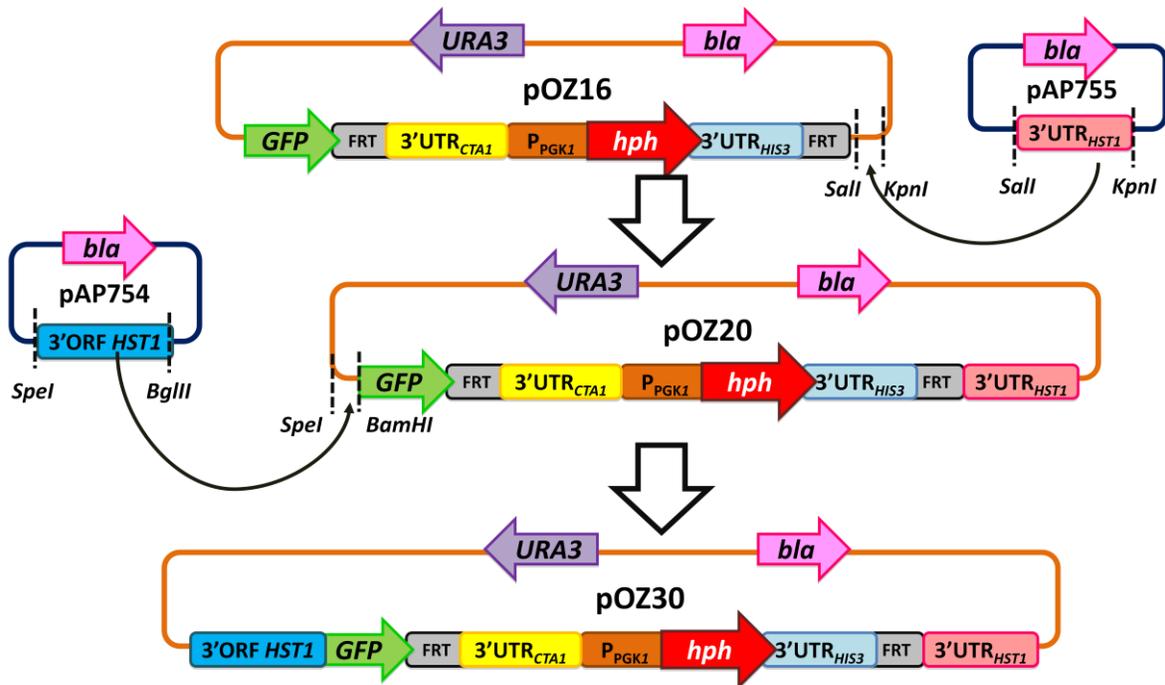


Figura 21. Generación de vectores para reemplazo génico con fusiones traducciónales. El extremo terminal del ORF de *HST1* sin codón de término (3'ORF *HST1*) está contenido en el plásmido pAP754, y su terminador (3'UTR) en pAP755. Primero se clonó el fragmento *Sall/KpnI* correspondiente al 3'UTR_{*HST1*}, en pOZ16 para dar lugar a pOZ20. El fragmento *SpeI/BglII* de 3'ORF *HST1* se clonó en pOZ20 digerido con *SpeI/BamHI*, para fusionar traducciónalmente a *HST1* con *GFP*. La clonación se realizó en este orden porque la incorporación del 3'UTR_{*HST1*} al vector, no agrega más sitios *SpeI* o *BamHI*, necesarios para la clonación siguiente. En cambio, en la operación inversa, la incorporación del 3'UTR_{*HST1*} en el vector, se complicaría porque el fragmento 3'ORF *HST1* adiciona otro sitio *KpnI*.

Las construcciones finales con las proteínas quiméricas, pOZ30(*HST1::GFP*) y pO32(*HST1::c-Myc13*), fueron secuenciadas antes de transformar a *C. glabrata*. En la figura S2 del apartado de anexos se muestra la parte del electroferograma que comprende la fusión, y se demuestra que en ambos casos, *HST1* se encuentra en la misma fase que los epítomos.

Posteriormente, los vectores fueron digeridos dentro de las dos regiones homólogas de *HST1* para favorecer la recombinación al transformar *C. glabrata*.

De este modo, por un sólo paso, se reemplazó la secuencia nativa por las fusiones traduccionales. La ventaja de este reemplazo génico es que permite seleccionar directamente a las transformantes en base a la resistencia a higromicina, mientras que el terminador provisional de la catalasa, estabiliza el transcrito de la proteína quimérica (figura 22).

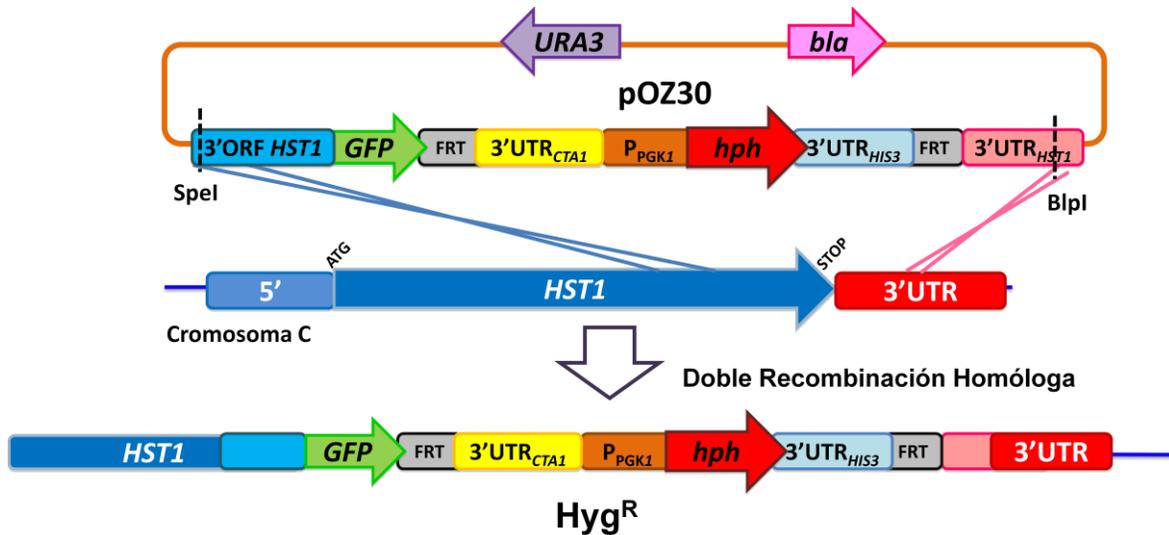


Figura 22. Fusión con epítomos por un sólo paso (doble recombinación homóloga). Se ejemplifica el proceso seguido para el reemplazo del gen silvestre de *HST1* por la versión marcada con *GFP*. Para la transformación, el pOZ30 fue digerido con *SpeI*/*BplI*, sitios de restricción que por encontrarse en la secuencia endógena sirven para integrar la fusión traduccional mediante doble recombinación homóloga. Tras el reemplazo, el ORF de *HST1* se fusiona al epítipo mientras que el terminador de la catalasa sustituye al 3'UTR nativo y estabiliza temporalmente al transcrito. La inserción del casete de resistencia a higromicina facilita la selección de las transformantes.

En este trabajo *HST1* fue marcado con *GFP* y *c-Myc13* por un sólo paso. Sin embargo, en otros casos puede existir solamente un sitio de restricción dentro de alguna de las dos regiones homólogas del gen a marcar. Esta circunstancia obliga que el reemplazo ocurra en dos pasos. Primero se integra el vector lineal en el locus del gen a marcar. Después de la recombinación, se seleccionan las colonias segregantes que complementen la auxotrofia por uracilo y se comprueba por PCR que la integración ocurrió en el locus correspondiente. Finalmente, para la resolución, se seleccionan las células que hayan perdido el gen *URA3* mediante el uso del ácido 5-fluorótico. Este compuesto análogo a un precursor del uracilo es convertido por *Ura3p* a fluorodeoxiuridina que es tóxico para las células. El gen

URA3 puede eliminarse o permanecer mediante la recombinación de las secuencias homólogas del vector y las endógenas. De acuerdo con observaciones experimentales, es mayor la probabilidad de que se incorpore el gen marcado con el epítipo, conforme mayor sea la longitud de la región homóloga opuesta a la que se utilizó para la integración (figura 23).

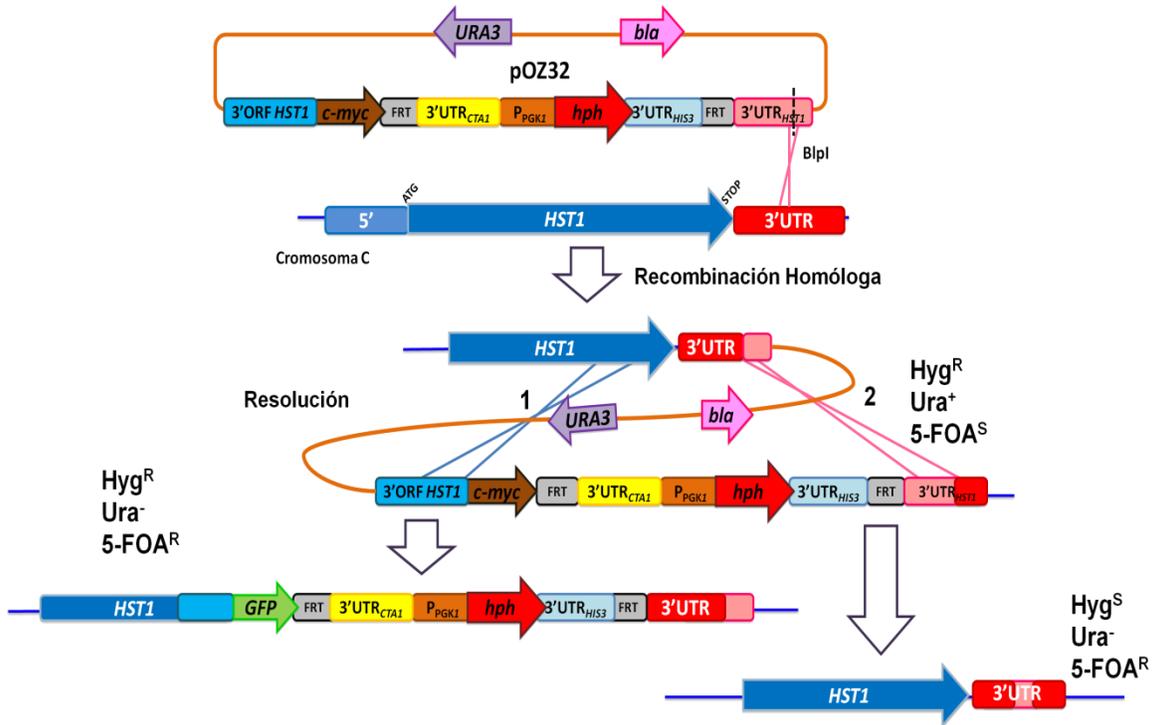


Figura 23. Marcaje con epítipos por dos pasos (integración y resolución). En este ejemplo, la ausencia de sitios de restricción en ambas regiones homólogas imposibilita la transformación por un paso. A través del corte del sitio único del terminador, el vector es integrado al locus de *HST1*. Las segregantes se seleccionan en medio sin uracilo o con higromicina. Para resolver la integración, las cepas segregantes se tratan con 5-FOA, un compuesto que en presencia de *URA3*, intoxica a las células. Para evitar la muerte celular, el gen *URA3* se elimina mediante recombinación homóloga, con dos posibles resultados: 1) La recombinación en el extremo opuesto de la integración genera el genotipo deseado, la fusión traduccional reemplaza al gen nativo, o 2) la recombinación en el mismo lugar de la integración regenera el alelo silvestre.

Una vez que se obtuvieron las colonias resistentes a higromicina, se extrajo ADN genómico y mediante PCR se verificó el reemplazo génico. Para el diagnóstico utilizaron los oligonucleótidos específicos para comprobar la integración en ambos extremos (5' y 3') y la del fragmento completo (figura 24). En la figura S3 de los anexos, se muestran las bandas correspondientes al diagnóstico por PCR para *HST1* marcado con ambos epítipos.

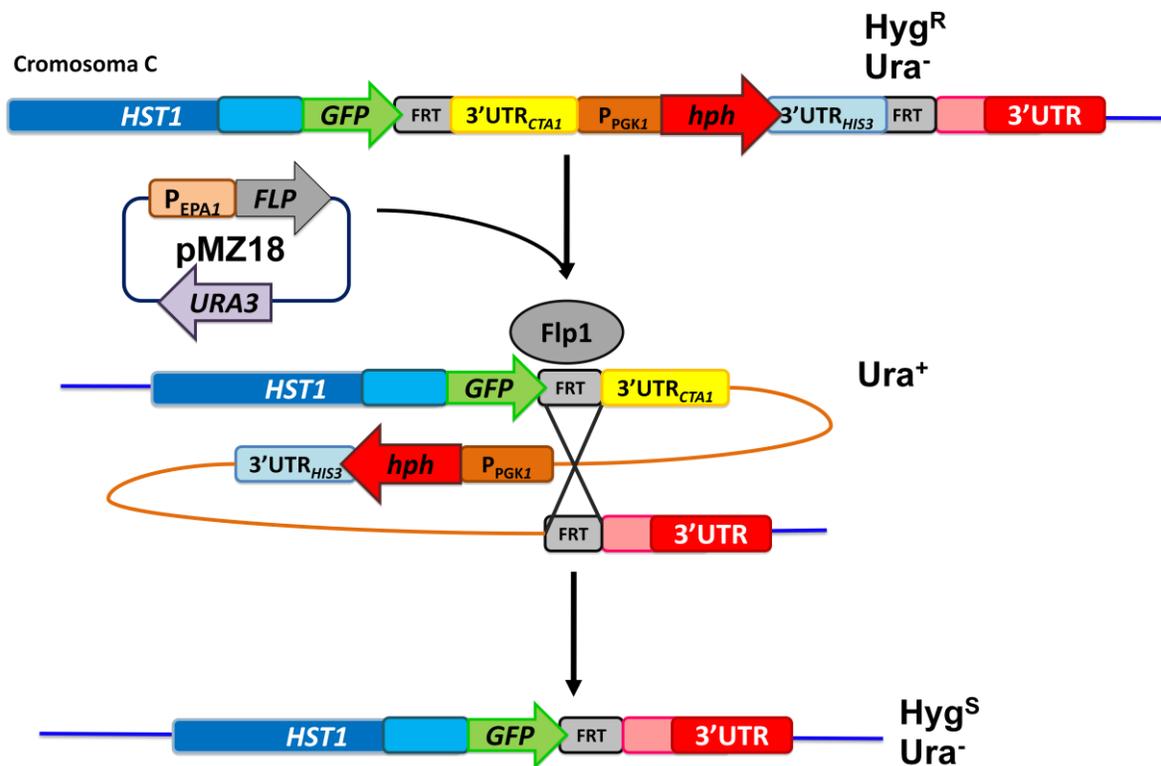


Figura 25. Eliminación del casete de resistencia a higromicina con incorporación simultánea del terminador nativo. Las cepas con la fusión traduccional se transformaron con el pMZ18, que codifica para la recombinasa Flp1p de *S. cerevisiae* y se seleccionaron en medio sin uracilo (CAA). Tras la inducción de la expresión de Flp1p con medio fresco (YPD) en fase logarítmica, se escindió el casete de resistencia junto al terminador de la catalasa, permitiendo que el terminador nativo se coloque después de la fusión traduccional.

Con esta estrategia se generaron fusiones traduccionales de *HST1* con *GFP* y *c-Myc13*, que potencialmente, servirán para localizar a la desacetilasa bajo diferentes estímulos (estrés oxidante o fluconazol) y detectar las interacciones con secuencias génicas y otros polipéptidos (Sum1p y Rfm1p).

3.9. LA SECUENCIA DEL REPRESOR Sum1p DE *C. glabrata* ES NOTABLEMENTE DISTINTA A LA DEL ORTÓLOGO DE *S. cerevisiae*.

C. glabrata y *S. cerevisiae* comparten el 62% de identidad nucleotídica en la secuencia de *HST1* y CgHst1p es 74% similar a ScHst1p. Sin embargo, a pesar de la conservación, regulan negativamente un grupo muy distinto de genes. En *S. cerevisiae*, Hst1p forma un complejo con Rfm1p y Sum1p (HRS) para el silenciamiento puntual de genes que contienen la secuencia MSRE. En este trabajo se demostró que una cepa mutante de *C. glabrata* en el factor transcripcional *SUM1*, comparte los fenotipos descritos por la ausencia de *HST1*. Esto sugiere que la represión transcripcional por la sirtuina depende también del represor (Sum1p). Es probable que el diferente control transcripcional entre las mutantes de *S. cerevisiae* y *C. glabrata* que carecen de Hst1p, sea consecuencia de un represor distinto que cambió en la secuencia de reconocimiento de Sum1p (MSRE).

Por sintenia se ha determinado que el gen ortólogo a *SUM1* en *C. glabrata* es CAGL0J10956. Sin embargo, el análisis de secuencias de aminoácidos para el factor Sum1p de varias especies de hemiascomicetos, revelan que esta proteína es solamente un 23,5% similar a su ortólogo de *S. cerevisiae* y que el mayor grado de similitud (28,0%) se encuentra con el ortólogo de *Kluyveromyces lactis*. El árbol filogenético de la figura 26, ilustra que el represor Sum1p de *C. glabrata* es notablemente distinto al de *S. cerevisiae*, aún cuando estas levaduras son filogenéticamente cercanas (figura 2). Por otra parte, el alineamiento global de secuencias de Sum1p de la figura 27, indica que la región más conservada del represor de *C. glabrata* se encuentra en el extremo N-terminal. Esto sugiere que probablemente esta región medie la interacción con Rfm1p para el reclutamiento de Hst1p y dirigir el silenciamiento.

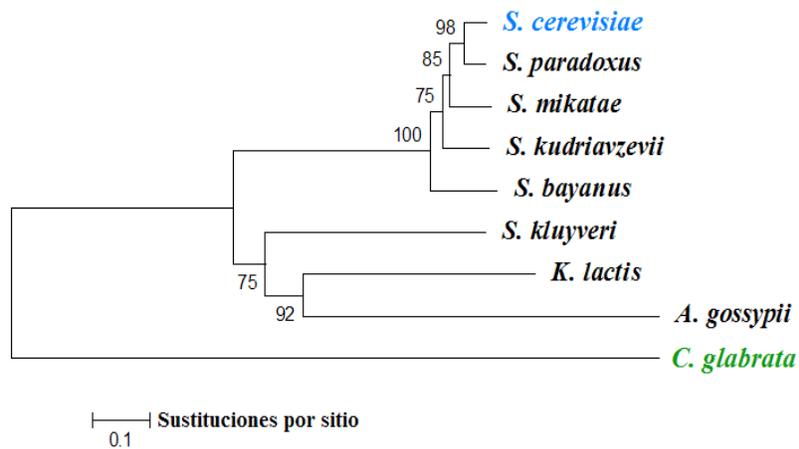
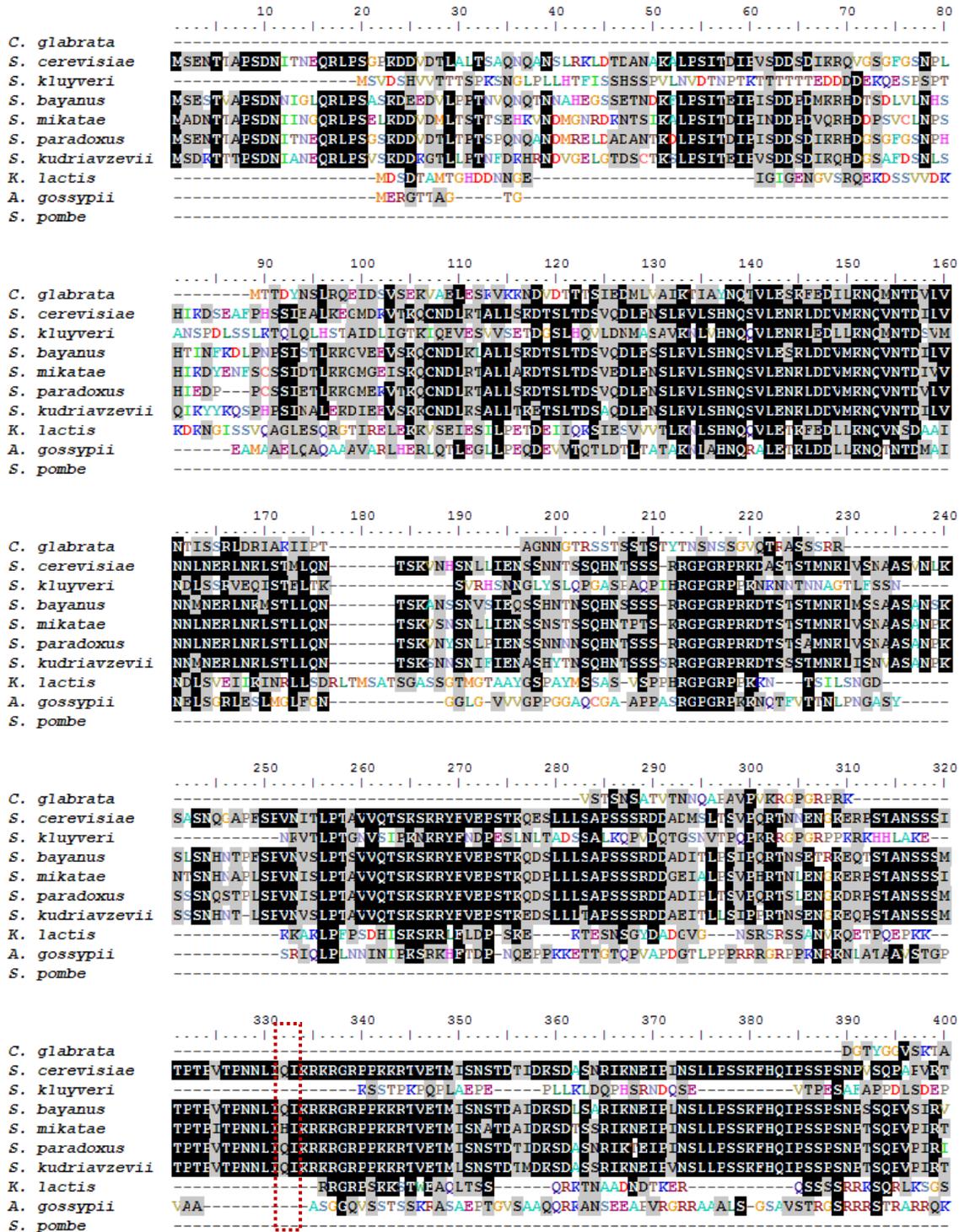


Figura 26. Árbol filogenético de secuencias Sum1p de hemiascomicetos. El diagrama fue trazado por el método del vecino más cercano (NJ), a partir del alineamiento global de las secuencias proteicas del represor Sum1p de varias especies de hemiascomicetos. Se representa el árbol consenso inferido a partir de 1000 repeticiones con prueba “bootstrap”. El porcentaje de árboles replicados en los que las especies se agruparon juntas en la prueba de “bootstrap” se muestran arriba de cada rama.



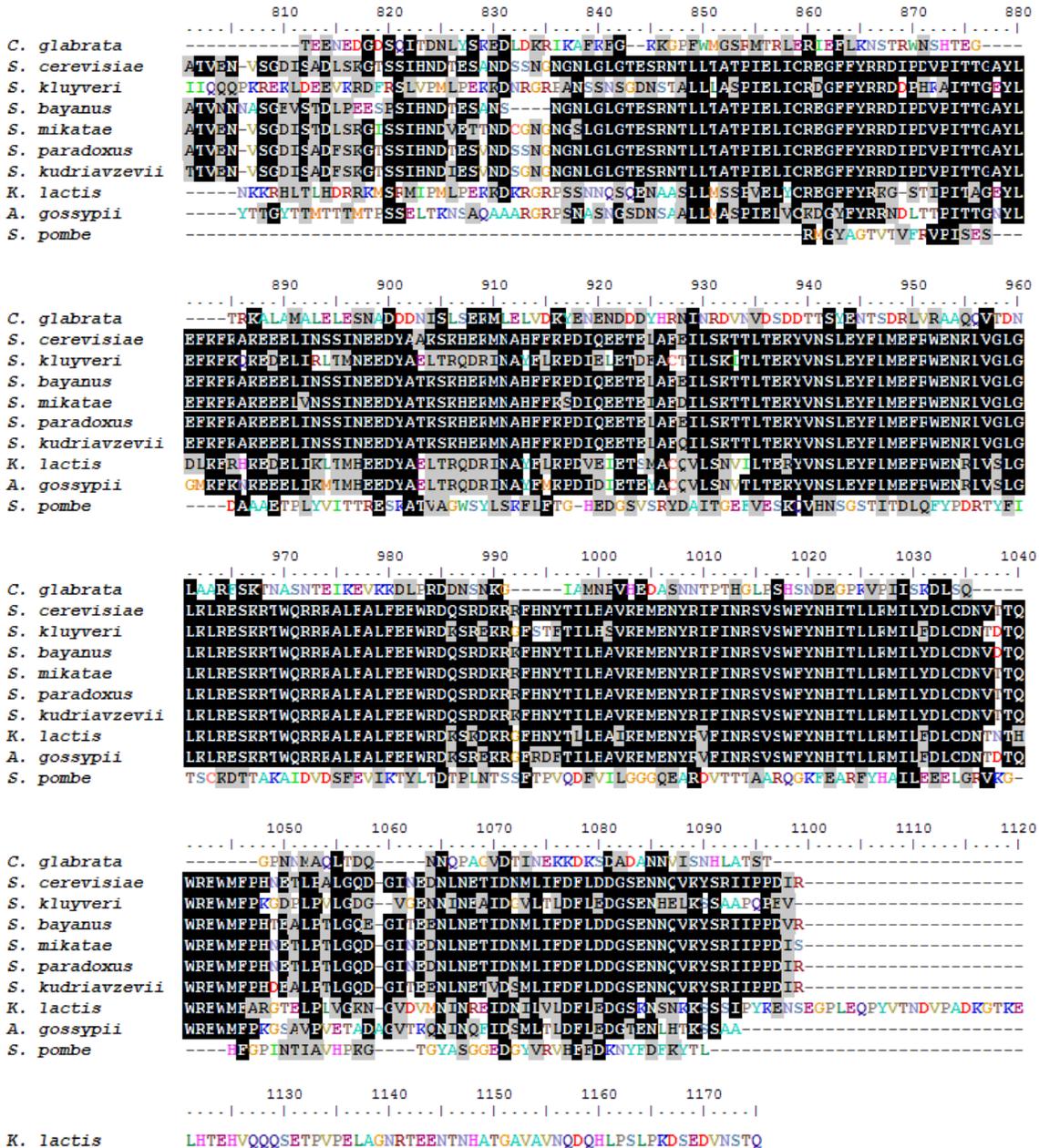


Figura 27. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de Sum1p por clustalW. La secuencia del represor de *C. glabrata* es notoriamente distinta al resto de las secuencias de los ortólogos encontrados para otras levaduras, incluyendo *S. cerevisiae* y *K. lactis*. El mayor grado de similitud se encuentra en la porción N-terminal de la proteína, que en *S. cerevisiae* se ha descrito es importante para la interacción con Rfm1p, sin embargo, en *C. glabrata* no se conservan los aminoácidos Q324 e I325 los cuales se ha reportado son importantes para la formación del complejo en *S. cerevisiae* (marcados en rectángulo rojo) (Mead *et al.*, 2007).

4. DISCUSIÓN

Candida glabrata es una levadura haploide, no dimórfica, filogenéticamente relacionada con *S. cerevisiae*, que en condiciones de atenuación inmunológica del hospedero, es capaz de causar severas infecciones sistémicas (Trick *et al.*, 2002). La relevancia epidemiológica de las infecciones causadas por esta levadura, yace en el incremento en la incidencia en las dos últimas décadas y en el elevado índice de mortalidad al que se asocian (Li *et al.*, 2007; Pfaller and Diekema, 2007). En la actualidad, con el fin de desarrollar tratamientos eficientes para el control de estas candidiasis, se han incrementado el número de esfuerzos que intentan comprender los mecanismos moleculares que dotan de virulencia a *C. glabrata*.

Como patógeno oportunista exitoso, *C. glabrata* se ha adaptado para sobrevivir en el hospedero y causarle enfermedad. Por experimentos *in vitro*, se ha demostrado que esta levadura se adhiere con avidez a células epiteliales de mamífero y que posee una eficiente respuesta a estrés oxidante que podría favorecer su supervivencia a los mecanismos microbicidas de los fagocitos (Castano *et al.*, 2005; Cuellar-Cruz *et al.*, 2008). Además, *C. glabrata* desarrolla frecuentemente resistencia a los fungistáticos azólicos que se utilizan como profilácticos para el tratamiento de las candidiasis, lo que dificulta la recuperación de los pacientes infectados con esta levadura (Berrouane *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2008; Ruan *et al.*, 2008). Resulta interesante que por resultados de trabajos anteriores y del nuestro, se ha sugerido que la regulación de algunos de éstos factores de virulencia, involucra un control negativo por maquinaria de silenciamiento puntual (Hst1p) y regional (Sir2p), operado por desacetilasas de histonas dependientes de NAD⁺, conocidas como sirtuinas (Canas-Villamar, 2007; Castano *et al.*, 2005; De Las Penas *et al.*, 2003; Domergue *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2009).

Por análisis de secuencias proteicas, determinamos que de Hst1p de *C. glabrata* es 74% similar al ortólogo de *S. cerevisiae*. Sin embargo, cuando comparamos los perfiles transcripcionales de cepas mutantes en esta sirtuina para ambas levaduras, encontramos que sólo regulan 19 genes en común (Hirao *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2009). De acuerdo con esta observación, encontramos que la

ausencia de *HST1* en *C. glabrata* produce algunos fenotipos no descritos en *S. cerevisiae*. Pero ¿por qué desacetilasas tan semejantes controlan genes distintos en organismos filogenéticamente relacionados?

En *S. cerevisiae*, el represor Sum1p reconoce el SRE y a través de Hst1p, silencia un juego selecto de genes de manera específica de promotor (McCord *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 1999). Las cepas mutantes *hst1Δ* y *sum1Δ* de *C. glabrata*, comparten los mismos fenotipos entre sí, lo que sugiere que Sum1p y Hst1p participan en la misma vía. Consideramos que el distinto perfil transcripcional entre estas levaduras, puede explicarse por las diferencias sustanciales entre los represores Sum1p que reclutan a la desacetilasa (23,5% similar; véanse figuras 26 y 27). Éstos mismos análisis de secuencias indican que, a pesar del bajo grado de similitud del factor transcripcional, la región más conservada es su extremo N-terminal, el cual en *S. cerevisiae* posee residuos importantes para la interacción con Rfm1p y por ende con Hst1p (McCord *et al.*, 2003). Sin embargo, analizamos algunas regiones intergénicas de los genes de *C. glabrata* regulados negativamente por Hst1p (*TNR1*, *TNR2*, *TNA1*, *CDR1*, *YBT1*, *HSP12*, *HXT2*) en la base de datos para secuencias consenso de reguladores transcripcionales (YEASTRACT <http://www.yeasttract.com/>) y carecen del elemento de la esporulación intermedia (MSRE) descrito como blanco de Sum1p (datos no mostrados). Consideramos probable que CgSum1p dirija la regulación de los genes silenciados por CgHst1p, mediante el reconocimiento de una secuencia distinta al MSRE.

En *C. glabrata*, a pesar de la estrecha similitud entre Sir2p y su parálogo más cercano (73%), Hst1p controla negativamente un mayor número de genes, que además de no empalmarse con los regulados por Sir2p, se encuentran dispersos por todo el genoma (Ma *et al.*, 2009). Nuestros resultados, respaldan la observación de que estas desacetilasas regulan genes distintos y poseen funciones no sobrelapantes, ya que la presencia de *SIR2*, no suprime los fenotipos de la cepa *hst1Δ* en ninguno de los ensayos evaluados (véanse figuras 12, 14 y 15).

Los datos presentados en este estudio sugieren que mediante la pérdida del silenciamiento controlado por Hst1p/Sum1p, se induce una moderada respuesta antioxidante en fase logarítmica que depende de la catalasa (figura 12 y 13) y posiblemente de otros factores implicados en la respuesta a estrés (tabla 6).

Por otra parte, aún no comprendemos la causa del lento crecimiento en medio rico (YPD) de las cepas mutantes que carecen de *HST1* o *SUM1*. Creemos que la sobreexpresión de algunos genes son los responsables de dicho fenotipo, pero este supuesto no explica porqué las mismas cepas restauran su tiempo de duplicación en medio sin uracilo (CAA). Es posible que la diferencia en la proporción de los nutrientes o el pH de los medios, determine el comportamiento de estas cepas; sin embargo, deberemos realizar otros ensayos para esclarecer esta observación. No obstante, consideramos que este retraso en el crecimiento podría presentar una ventaja para la supervivencia de la levadura *in vivo*, ya que el arresto en el ciclo celular comprende una parte de la respuesta a estrés oxidante (Flattery-O'Brien and Dawes, 1998; Fong *et al.*, 2008). Se ha propuesto que de esta forma la célula puede montar una respuesta antioxidante que depure y repare los componentes dañados (Perrone *et al.*, 2008).

Además, las cepas mutantes *hst1Δ* y *sum1Δ*, incrementan considerablemente su resistencia a fluconazol (figura 15), tal vez mediante la inducción de distintos transportadores del tipo ABC y de la MFS que expulsan activamente el fármaco hacia el exterior de la célula (tabla 8).

Finalmente, por datos del microarreglo de Ma y cols. (2009) conocemos que en ausencia de Hst1p, se induce la proteasa *YPS3* (4,2 veces) implicada en la virulencia de *C. glabrata* (Kaur *et al.*, 2007) y también se sobreexpresan genes que transportan nutrientes y de precursores del NAD^+ , importante cofactor para el que esta levadura es auxótrofa (tabla 9).

Tabla 9. Transportadores de nutrientes que se inducen en la cepa <i>hst1Δ</i> .			
Gen	SE	Comentario	Referencia
<i>TNR1</i> ‡	201,9	Transportadores de nicotinamida (NAM) y ribósido de nicotinamida (NR). Precusores necesarios para la síntesis de NAD ⁺ por las rutas de salvamento en <i>C. glabrata</i>	(Ma <i>et al.</i> , 2009)
<i>TNR2</i> ‡	164,6		
<i>TNA1</i> ‡	20,8	Transportador de ácido nicotínico (AN), nicotinamida (NAM) y ribósido de nicotinamida (NR). Precusores necesarios para la síntesis de NAD ⁺ por las rutas de salvamento en <i>C. glabrata</i> .	(Ma <i>et al.</i> , 2009)
<i>HXT2</i>	10,9	Transportador tipo MFS de alta afinidad por glucosa. Se induce en respuesta a bajos niveles de glucosa. Controlado por los detectores de glucosa: Rgt2p/Snf3p.	(Ozcan <i>et al.</i> , 1998)
<i>AVT4</i>	6,6	Exporta aminoácidos (aa) neutros desde la vacuola. Relacionado a transportadores de GABA-glicina. Involucrado en el reciclaje de aminoácidos por autofagia.	(Yang and Klionsky, 2007)
<i>HXT5</i>	6,5	Transportador tipo MFS de moderada afinidad por glucosa. Inducible en presencia de fuentes de carbono no-fermentables y por un descenso en el índice de crecimiento. Responde a condiciones de estrés y a cambio post-diáuxico	(Verwaal <i>et al.</i> , 2004)
<i>PUT4</i>	6,4	Permeasa de alta afinidad por Pro.	(Vandenbol <i>et al.</i> , 1989)
<i>AGP1</i>	4,7	Permeasa de aa, baja afinidad con amplio espectro de sustratos. Involucrada en la captura de Asn, Gln y otros aa. Regulada por el complejo detector SPS. (Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p)	(Forsberg <i>et al.</i> , 2001; Schreve <i>et al.</i> , 1998)
<i>MCH5</i> ‡	4,2	Transportador de riboflavina (Vit. B ₂), regulado por Put3p. Requerido para procesos dependientes de FAD.	(Spitzner <i>et al.</i> , 2008)
<i>HXT1</i> ‡	3,4	Transportador tipo MFS de baja afinidad por glucosa. Se induce por Hxk2p en presencia de glucosa.	(Petit <i>et al.</i> , 2000)
<i>THI7</i>	3,2	Transportador tipo MFS para la captura de tiamina (Vit. B ₁).	(Singleton, 1997)
<i>FUR4</i>	2,9	Permeasa de uracilo finamente regulada.	(Hein <i>et al.</i> , 1995)
<i>AGP2</i>	2,7	Permeasa de alta afinidad por poliaminas y de baja por aa. Activada en condiciones limitantes de nitrógeno.	(Schreve and Garrett, 2004)
<i>DIP5</i>	2,7	Permeasa de aa dicarboxílicos (Asp, Glu). Tambien transporta Gln, Asn, Ser, Ala, y Gly.	(Regenberg <i>et al.</i> , 1998)
<i>BAP1</i>	2,6	Permeasa de aa que transporta Val, Cys e Ile.	(During-Olsen <i>et al.</i> , 1999)
<i>RGT2</i>	2,5	Receptor de glucosa de membrana plasmática. Junto a Snf3p detectan los niveles de glucosa y modulan la actividad de transportadores HXT.	(Moriya and Johnston, 2004)

‡Genes inducidos durante limitación de niacina en *C. glabrata* (Ma *et al.*, 2009)

En su conjunto, parece que algunos genes regulados negativamente por CgHst1p podrían ser favorables para la supervivencia del patógeno ante el estrés oxidante del estallido respiratorio en el fagosoma, durante la limitación de nutrientes y la exposición a fungistáticos. En las tablas 6, 8 y 9, hemos enlistado genes que además de inducirse en ausencia de *HST1*, también se sobreexpresan en condiciones de limitación de niacina y cuando *C. glabrata* es fagocitada.

Consideramos probable la existencia de una o varias señales que conlleven hacia la desactivación de esta sirtuina y promuevan de esta forma, la entrada a un estado celular protector, preparado para soportar distintas condiciones de estrés, pero ¿qué señales podrían desactivar a Hst1p?

Dentro del motivo conservado que coordina el átomo de zinc en las sirtuinas, existe una secuencia CPYC (figura 9), que comparten con el sitio activo de las glutarredoxinas (Grx1p y Grx2p) (Foloppe and Nilsson, 2004; Sauve *et al.*, 2006). Se ha documentado que en proteínas con iones de zinc coordinados por cisteínas, el zinc actúa como un ácido de Lewis que desciende el pK_a de los tioles y modifica su reactividad. En consecuencia, la oxidación de las cisteínas conlleva a la liberación del átomo de zinc y a la pérdida de la actividad de la proteína (D'Autreaux and Toledano, 2007). Una posibilidad es que en respuesta a estrés oxidante, Hst1p y otras sirtuinas, detecten alteraciones oxidoreductoras a través de la oxidación directa o indirecta del motivo CPYC, que comprometan su actividad desacetilasa cuando los niveles de peróxido de hidrógeno se eleven en el interior de la célula.

Otra alternativa es que la inactivación de Hst1p se derive de la disminución de los niveles intracelulares del cofactor NAD^+ , indispensable para la actividad de todas las sirtuinas (Sauve *et al.*, 2006). Tanto en *S. cerevisiae* como en *C. glabrata*, Hst1p es la sirtuina que posee menor afinidad por NAD^+ y por lo tanto, es la más susceptible a perder su actividad cuando la concentración del cofactor desciende (Bedalov *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2009). Se ha propuesto que la estrecha relación con el hospedero, ha despojado a *C. glabrata* de los genes necesarios para la biosíntesis del NAD^+ a partir del triptófano (Domergue *et al.*, 2005), quedando sólo la ruta de salvamento que sintetiza el cofactor a partir de niacina (NA, NAM y NR) (Ma *et al.*, 2007). La baja concentración de los niveles de NAD^+ , resultante de la limitación ambiental de niacina, causa la desrepresión de genes de adhesinas *EPA* controlados por la desacetilasa Sir2p (Domergue *et al.*, 2005).

Aunque también se ha sugerido que los niveles del NAD^+ , además de depender de la disponibilidad ambiental, también se modifican durante el estrés oxidante. En bacterias la NAD^+ cinasa (*Nadk*) convierte el NAD^+ a $NADP^+$ y

confiere dos efectos útiles, disminuye la poza del NADH tóxico e incrementa la concentración del NADPH protector (Grose *et al.*, 2006). Congruente con esta observación, el ortólogo de *Nadk* en *S. cerevisiae* corresponde a *POS5* y es requerido para responder frente a estrés oxidante (Strand *et al.*, 2003). Resulta interesante que *C. glabrata* también cuenta con un ortólogo a *POS5* (CAGL0G02893) y que se induce 2,1 veces en ausencia de *HST1* (Ma *et al.*, 2009).

En la figura 28 se esquematiza un modelo en el que proponemos que la inactivación de las sirtuinas podría ser benéfico para las células. Una señal ambiental de estrés oxidante o limitación de niacina, inactiva las sirtuinas (Hst1p y Sir2p), y resulta en la pérdida transitoria del silenciamiento puntual y regional. Bajo esta condición, la cromatina permanece permisiva para que otros factores transcripcionales induzcan sus genes blanco y promuevan la protección celular. Sin el control negativo de Hst1p, se desreprimen genes que protegen frente al estrés oxidante y los azoles, a la par que permiten una mayor captación de nutrientes. Por su parte, la inactivación de Sir2p, permite la transcripción de adhesinas subtelméricas, útiles en la colonización de los tejidos del hospedero. Sin embargo, es posible que esta respuesta sea temporal, ya que la inactivación permanente de Sir2p compromete el ciclo de vida replicativo de la células hijas por el aumento de la recombinación del ADN ribosómico y la acumulación de círculos extracromosómicos de ADN ribosomal (ERCs) (Steinkraus *et al.*, 2008). Además el NAD^+ y sus equivalentes reducidos y fosforilados son indispensables para varios procesos celulares. Afortunadamente, cuando Hst1p se inactiva, también se inducen genes implicados en la captación de precursores de NAD^+ , que restituyen los niveles de este cofactor en condiciones limitantes (Ma *et al.*, 2007). La restauración de los niveles de NAD^+ , activa a Sir2p para silenciar nuevamente el ADNr y controlar la producción de ERCs, al mismo tiempo que podría proveer del sustrato a Pos5p para combatir el estrés oxidante.

5. CONCLUSIONES

La desacetilasa de histonas Hst1p de *C. glabrata* es altamente similar (74%) a su ortólogo en *S. cerevisiae*, pero controla negativamente un grupo de genes distinto. En contraste, el represor Sum1p que recluta a Hst1p para el silenciamiento específico de promotor sólo se parece un 23% entre ambas especies. Es probable que los cambios que ha experimentado CgSum1p le permiten controlar un grupo de genes distinto al que regula el gen ortólogo en *S. cerevisiae*, probablemente a través del reconocimiento de una secuencia diferente al MSE.

En ausencia de Hst1p o Sum1p, se induce una moderada respuesta antioxidante durante el crecimiento replicativo de *C. glabrata*. El aumento en la resistencia y adaptación a peróxido de hidrógeno, es conferido por la catalasa ya que la pérdida concomitante de la metaloenzima conlleva a hipersensibilidad hacia el agente oxidante.

La desrepresión génica causada por la falta del factor transcripcional Sum1p o la desacetilasa Hst1p, también incrementa la resistencia a fluconazol en fase estacionaria. El mecanismo probablemente implique la transcripción de genes codificantes para transportadores proteicos que expulsan activamente el fármaco.

Inexplicablemente, las cepas mutantes *hst1Δ* y *sum1Δ* extienden su tiempo de duplicación en medio rico, pero restablecen su velocidad de crecimiento en medio casaminoácidos. Es menester identificar los componentes o condiciones que suprimen el fenotipo, para esclarecer el mecanismo que origina este drástico cambio.

En *C. glabrata*, Sir2p no es capaz de silenciar los genes controlados por Hst1p, ya que en su ausencia no suprime los fenotipos de una cepa *hst1Δ*.

En relación a los genes que regulan las sirtuinas, es posible que la inhibición del silenciamiento en *C. glabrata*, le confiera una ventaja en la supervivencia y colonización del hospedero.

6. PERSPECTIVAS

Los microarreglos de Ma y cols. (2009) sugieren la inducción de numerosos genes en ausencia de la Hst1p. Por medio de RT-PCR, analizaremos los niveles de transcrito de algunos genes partícipes en la respuesta a estrés y a fluconazol en las cepas *hst1Δ* y *sum1Δ*, para respaldar los fenotipos observados en este estudio.

Con base en el antecedente de que las cepas *hst1Δ* y *sum1Δ* comparten los mismos fenotipos, predecimos que una cepa *rfm1Δ* se comportará idéntica a éstas mutantes, es decir será resistente a peróxido de hidrógeno y fluconazol. Para demostrarlo, obtendremos una cepa mutante por reemplazo de *RFM1* (CAGL0L11022) y realizaremos los ensayos de sensibilidad.

En particular, nos interesa demostrar la existencia del complejo Hst1p-Rfm1p-Sum1p (HRS) en *C. glabrata* y comprobar por CHIP, su asociación con los genes que se inducen en ausencia de la sirtuina. Con este propósito, hemos desarrollado vectores con epítomos distintos que nos permiten fusionar cualquier proteína de *C. glabrata*. Hasta el momento contamos con una cepa que tiene *HST1* marcado con *c-Myc13* y hemos diseñado oligonucléotidos para fusionar a *SUM1* con otro epítomo (*HA* o *FLAG*). Con estas herramientas pretendemos inmunoprecipitar las proteínas y comprobar la existencia del complejo HRS usando anticuerpos monoclonales dirigidos contra los epítomos, permitiendo también copurificar otras proteínas asociadas. Las proteínas marcadas también nos permitirán realizar ensayos CHIP para detectar enriquecimientos del complejo en los genes controlados negativamente por Hst1p.

Proponemos que Hst1p de *C. glabrata* silencia distintos genes a los que reprime su ortólogo en *S. cerevisiae*, probablemente debido a que el factor transcripcional Sum1p es sustancialmente entre estas levaduras. Para evaluar esta suposición, estudiaremos el comportamiento fenotípico de una cepa mutante nula de *C. glabrata* en este represor (*sum1Δ*) cuando porta el factor Sum1p de *S.*

cerevisiae. Si la predicción es cierta, entonces el represor Sum1p de *S. cerevisiae* será incapaz de complementar a la cepa mutante.

Como parte de los experimentos que evaluarán al modelo propuesto, analizaremos en una cepa silvestre los niveles de transcrito de genes regulados por sirtuinas, cuando es expuesta a una baja concentración de niacina o estrés oxidante. Esperamos que en éstas condiciones se induzcan genes de respuesta a estrés, permeasas y bombas tipo ABC o MFS.

Por otra parte, mediante ensayos de sensibilidad *in vitro*, podremos determinar si una exposición previa a condiciones limitantes de niacina confiere resistencia a fluconazol y estrés oxidante. Como control podremos tratar a las células con un inhibidor específico de las sirtuinas, la “*splitomicina*” (Bedalov *et al.*, 2001) y comparar su REO y sensibilidad a fluconazol. También hemos propuesto que posiblemente un estímulo oxidante disminuya la concentración intracelular de NAD⁺ e inactive a las sirtuinas. Una forma de evaluar esta suposición implica tratar a la cepa silvestre con una dosis subletal de peróxido de hidrógeno y después determinar su sensibilidad a peróxido. La predicción es que las células serán más resistentes que sin exposición previa al estímulo oxidante.

Además hemos diseñado oligonucleótidos para mutar el dominio CPYC de *HST1* y reemplazar las cisteínas 344 y 347 por alaninas, permitiendo al mismo tiempo su marcación con *GFP*. De esta forma, por microscopia fluorescente se comparará la ubicación de esta versión mutante de Hst1p, con la proteína quimérica silvestre generada en este trabajo y podremos determinar si existe diferencia en la localización intracelular de Hst1p cuando carece de su actividad desacetilasa en condiciones normales o bajo diferentes estímulos (limitación de niacina, estrés oxidante o exposición a fluconazol).

Finalmente, hemos propuesto que las sirtuinas pueden ser susceptibles a oxidación a través del motivo CPYC. La detección del estado oxidoreductor de una proteína, se puede realizar mediante el cambio de movilidad electroforética en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). Una proteína en estado

reducido contiene cisteínas libres y cuando se oxida, los grupos tioles de estos aminoácidos forman puentes disulfuro. El estado reducido de una proteína se detecta mediante el uso de una sonda alquilante que sólo reaccionan con los grupos tioles libres, el AMS (Ácido 4-Acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico). El número de cisteínas libres será directamente proporcional a la alquilación de la proteína y al incremento de su peso molecular. En cambio, cuando la proteína se oxida, carece de grupos tioles que reaccionen con el AMS y su peso molecular no se modifica. Entonces en un gel de SDS-PAGE, la forma reducida se caracteriza por una menor migración electroforética que su equivalente en forma oxidada. Con este principio, el primer paso sería purificar a Hst1p::c-Myc13, reducir por completo todos sus posibles enlaces disulfuro con ditioneitol (DTT) y con AMS determinar su movilidad electroforética. Después, la proteína purificada se trata con un sistema oxidante adecuado y se evalúa la existencia de cambios oxidoreductores mediante alquilación con la sonda y por SDS-PAGE. En caso de que Hst1p se oxidara en el motivo CPYC o en otra región, existirá un cambio de movilidad electroforética. El control apropiado será la versión de Hst1p que carece de las cisteínas 344 y 347, ya que al contener alaninas que no reaccionan con el AMS, emula el estado de oxidación que probablemente se genera cuando Hst1p se oxida. En caso de ser cierta la suposición de que Hst1p se oxida en el dominio CPYC, se generará un desplazamiento electroforético comparable a la versión mutante sin cisteínas.

7. REFERENCIAS

- Agarwal, S., Sharma, S., Agrawal, V., and Roy, N. (2005) Caloric restriction augments ROS defense in *S. cerevisiae*, by a Sir2p independent mechanism. *Free Radic Res* **39**: 55-62.
- Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., and Nystrom, T. (2003) Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* **299**: 1751-1753.
- Alarco, A.M., Balan, I., Talibi, D., Mainville, N., and Raymond, M. (1997) AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires *FLR1* encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *J Biol Chem* **272**: 19304-19313.
- Babior, B.M. (1982) The enzymatic basis for O-2 production by human neutrophils. *Can J Physiol Pharmacol* **60**: 1353-1358.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**: 483-495.
- Bedalov, A., Gatbonton, T., Irvine, W.P., Gottschling, D.E., and Simon, J.A. (2001) Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15113-15118.
- Bedalov, A., Hirao, M., Posakony, J., Nelson, M., and Simon, J.A. (2003) NAD⁺-dependent deacetylase Hst1p controls biosynthesis and cellular NAD⁺ levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **23**: 7044-7054.
- Bennett, J.E., Izumikawa, K., and Marr, K.A. (2004) Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1773-1777.
- Berrouane, Y.F., Herwaldt, L.A., and Pfaller, M.A. (1999) Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. *J Clin Microbiol* **37**: 531-537.
- Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A., and Sunnerhagen, P. (2004) Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol* **53**: 1743-1756.
- Brachmann, C.B., Sherman, J.M., Devine, S.E., Cameron, E.E., Pillus, L., and Boeke, J.D. (1995) The *SIR2* gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev* **9**: 2888-2902.
- Buitron Garcia, R., Bonifaz, A., Amancio Chassin, O., Basurto Kuba, E., Araiza, J., and Romero Cabello, R. (2007) [Correlation between clinical characteristics and mycological tests in the vulvovaginitis by *Candida*]. *Ginecol Obstet Mex* **75**: 68-72.
- Butler, G., Rasmussen, M.D., Lin, M.F., Santos, M.A., Sakthikumar, S., Munro, C.A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J.L., Agrafioti, I., Arnaud, M.B., Bates, S., Brown, A.J., Brunke, S., Costanzo, M.C., Fitzpatrick, D.A., de Groot, P.W., Harris, D., Hoyer, L.L., Hube, B., Klis, F.M., Kodira, C., Lennard, N., Logue, M.E., Martin, R., Neiman, A.M., Nikolaou, E., Quail, M.A., Quinn, J., Santos, M.C., Schmitzberger, F.F., Sherlock, G., Shah, P., Silverstein, K.A., Skrzypek, M.S., Soll, D., Staggs, R., Stansfield, I., Stumpf, M.P., Sudbery, P.E., Srikantha, T., Zeng, Q., Berman, J., Berriman, M., Heitman, J., Gow, N.A., Lorenz, M.C., Birren, B.W., Kellis, M., and Cuomo, C.A. (2009) Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **459**: 657-662.
- Cadenas, E., and Davies, K.J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* **29**: 222-230.
- Calcagno, A.M., Bignell, E., Warn, P., Jones, M.D., Denning, D.W., Muhlschlegel, F.A., Rogers, T.R., and Haynes, K. (2003) *Candida glabrata* *STE12* is required for wild-type levels of virulence and nitrogen starvation induced filamentation. *Mol Microbiol* **50**: 1309-1318.

- Calcagno, A.M., Bignell, E., Rogers, T.R., Jones, M.D., Muhlschlegel, F.A., and Haynes, K. (2005) *Candida glabrata Ste11* is involved in adaptation to hypertonic stress, maintenance of wild-type levels of filamentation and plays a role in virulence. *Med Mycol* **43**: 355-364.
- Calderone, R.A., and Fonzi, W.A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 327-335.
- Calvin, N.M., and Hanawalt, P.C. (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* **170**: 2796-2801.
- Canas-Villamar, I. (2007) Caracterización de la respuesta a estrés oxidante por H₂O₂ en la levadura patógena oportunista *Candida glabrata*. In *División de Biología Molecular San Luis Potosí, México: IPICyT A. C.*, pp. 64.
- Castano, I., Pan, S.J., Zupancic, M., Hennequin, C., Dujon, B., and Cormack, B.P. (2005) Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **55**: 1246-1258.
- Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2172-2175.
- Cormack, B.P., and Falkow, S. (1999) Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**: 979-987.
- Cormack, B.P., Ghorri, N., and Falkow, S. (1999) An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* **285**: 578-582.
- Cuellar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Canas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castano, I., and De Las Penas, A. (2008) High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell* **7**: 814-825.
- D'Autreaux, B., and Toledano, M.B. (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 813-824.
- De Bernardis, F., Arancia, S., Morelli, L., Hube, B., Sanglard, D., Schafer, W., and Cassone, A. (1999) Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida vaginitis*. *J Infect Dis* **179**: 201-208.
- De Las Penas, A., Pan, S.J., Castano, I., Alder, J., Cregg, R., and Cormack, B.P. (2003) Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to *RAP1*- and *SIR*-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* **17**: 2245-2258.
- Dib, L., Hayek, P., Sadek, H., Beyrouthy, B., and Khalaf, R.A. (2008) The *Candida albicans* Ddr48 protein is essential for filamentation, stress response, and confers partial antifungal drug resistance. *Med Sci Monit* **14**: BR113-121.
- Dismukes, G.C., Klimov, V.V., Baranov, S.V., Kozlov, Y.N., DasGupta, J., and Tyryshkin, A. (2001) The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2170-2175.
- Domergue, R., Castano, I., De Las Penas, A., Zupancic, M., Lockett, V., Hebel, J.R., Johnson, D., and Cormack, B.P. (2005) Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* **308**: 866-870.
- Drakulic, T., Temple, M.D., Guido, R., Jarolim, S., Breitenbach, M., Attfield, P.V., and Dawes, I.W. (2005) Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **5**: 1215-1228.

- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J.M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J.M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G.F., Straub, M.L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P., and Souciet, J.L. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44.
- Dunn, C.D., Tamura, Y., Sesaki, H., and Jensen, R.E. (2008) Mgr3p and Mgr1p are adaptors for the mitochondrial i-AAA protease complex. *Mol Biol Cell* **19**: 5387-5397.
- During-Olsen, L., Regenber, B., Gjermansen, C., Kielland-Brandt, M.C., and Hansen, J. (1999) Cysteine uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is accomplished by multiple permeases. *Curr Genet* **35**: 609-617.
- Erjavec, N., and Nystrom, T. (2007) Sir2p-dependent protein segregation gives rise to a superior reactive oxygen species management in the progeny of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10877-10881.
- Estruch, F. (1991) The yeast putative transcriptional repressor *RGM1* is a proline-rich zinc finger protein. *Nucleic Acids Res* **19**: 4873-4877.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., Kondo, H., and Matsumoto, H. (1998) Protective roles of two aluminum (Al)-induced genes, *HSP150* and *SED1* of *Saccharomyces cerevisiae*, in Al and oxidative stresses. *FEMS Microbiol Lett* **159**: 99-105.
- Fabrizio, P., Pletcher, S.D., Minois, N., Vaupel, J.W., and Longo, V.D. (2004) Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **557**: 136-142.
- Fabrizio, P., Gattazzo, C., Battistella, L., Wei, M., Cheng, C., McGrew, K., and Longo, V.D. (2005) Sir2 blocks extreme life-span extension. *Cell* **123**: 655-667.
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Milligan, A.J., Fennel, K., Cramer, B.S., Aubry, M.P., Berner, R.A., Novacek, M.J., and Zapol, W.M. (2005) The rise of oxygen over the past 205 million years and the evolution of large placental mammals. *Science* **309**: 2202-2204.
- Ferrari, S., Ischer, F., Calabrese, D., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Fadda, G., Rohde, B., Bauser, C., Bader, O., and Sanglard, D. (2009) Gain of function mutations in *CgPDR1* of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS Pathog* **5**: e1000268.
- Fidel, P.L., Jr., Cutright, J.L., Tait, L., and Sobel, J.D. (1996) A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis* **173**: 425-431.
- Fidel, P.L., Jr., Vazquez, J.A., and Sobel, J.D. (1999) *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* **12**: 80-96.
- Finkel, T. (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 247-254.
- Flattery-O'Brien, J.A., and Dawes, I.W. (1998) Hydrogen peroxide causes *RAD9*-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of *RAD9* function. *J Biol Chem* **273**: 8564-8571.
- Foloppe, N., and Nilsson, L. (2004) The glutaredoxin -C-P-Y-C- motif: influence of peripheral residues. *Structure* **12**: 289-300.

- Fong, C.S., Temple, M.D., Alic, N., Chiu, J., Durchdewald, M., Thorpe, G.W., Higgins, V.J., and Dawes, I.W. (2008) Oxidant-induced cell-cycle delay in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the SWI6 transcription factor. *FEMS Yeast Res* **8**: 386-399.
- Forsberg, H., Gilstring, C.F., Zargari, A., Martinez, P., and Ljungdahl, P.O. (2001) The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. *Mol Microbiol* **42**: 215-228.
- Ghannoum, M.A. (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **13**: 122-143, table of contents.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A., and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425.
- Gietz, R.D., and Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., and Pelicci, P.G. (2007) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 722-728.
- Goldblatt, D., and Thrasher, A.J. (2000) Chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol* **122**: 1-9.
- Gonzalez, G.M., Elizondo, M., and Ayala, J. (2008) Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol* **46**: 2902-2905.
- Gotz, R., Gnann, A., and Zimmermann, F.K. (1999) Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. *Yeast* **15**: 855-864.
- Gregori, C., Bauer, B., Schwartz, C., Kren, A., Schuller, C., and Kuchler, K. (2007) A genetic screen identifies mutations in the yeast *WAR1* gene, linking transcription factor phosphorylation to weak-acid stress adaptation. *Febs J* **274**: 3094-3107.
- Grose, J.H., Joss, L., Velick, S.F., and Roth, J.R. (2006) Evidence that feedback inhibition of NAD kinase controls responses to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7601-7606.
- Guarente, L. (2008) Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* **132**: 171-176.
- Hampton, M.B., Fadeel, B., and Orrenius, S. (1998) Redox regulation of the caspases during apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **854**: 328-335.
- Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**: 298-300.
- He, X.J., and Fassler, J.S. (2005) Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **58**: 1454-1467.
- Hein, C., Springael, J.Y., Volland, C., Haguenaer-Tsapis, R., and Andre, B. (1995) NPI1, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol Microbiol* **18**: 77-87.
- Herrero, E., Ros, J., Belli, G., and Cabisco, E. (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 1217-1235.
- Hickman, M.A., and Rusche, L.N. (2007) Substitution as a mechanism for genetic robustness: the duplicated deacetylases Hst1p and Sir2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* **3**: e126.
- Hipkiss, A.R. (2008) Energy metabolism, altered proteins, sirtuins and ageing: converging mechanisms? *Biogerontology* **9**: 49-55.
- Hirao, M., Posakony, J., Nelson, M., Hruby, H., Jung, M., Simon, J.A., and Bedalov, A. (2003) Identification of selective inhibitors of NAD⁺-dependent deacetylases using phenotypic screens in yeast. *J Biol Chem* **278**: 52773-52782.

- Iraqi, I., Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Dromer, F., Ghigo, J.M., d'Enfert, C., and Janbon, G. (2005) The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol Microbiol* **55**: 1259-1271.
- Izumikawa, K., Kakeya, H., Tsai, H.F., Grimberg, B., and Bennett, J.E. (2003) Function of *Candida glabrata* ABC transporter gene, PDH1. *Yeast* **20**: 249-261.
- Jarvik, J.W., and Telmer, C.A. (1998) Epitope tagging. *Annu Rev Genet* **32**: 601-618.
- Kaeberlein, M., Steffen, K.K., Hu, D., Dang, N., Kerr, E.O., Tsuchiya, M., Fields, S., and Kennedy, B.K. (2006) Comment on "HST2 mediates SIR2-independent life-span extension by calorie restriction". *Science* **312**: 1312; author reply 1312.
- Kaeberlein, M., Burtner, C.R., and Kennedy, B.K. (2007) Recent developments in yeast aging. *PLoS Genet* **3**: e84.
- Kamran, M., Calcagno, A.M., Findon, H., Bignell, E., Jones, M.D., Warn, P., Hopkins, P., Denning, D.W., Butler, G., Rogers, T., Muhlschlegel, F.A., and Haynes, K. (2004) Inactivation of transcription factor gene *ACE2* in the fungal pathogen *Candida glabrata* results in hypervirulence. *Eukaryot Cell* **3**: 546-552.
- Kanazawa, S., Driscoll, M., and Struhl, K. (1988) ATR1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Mol Cell Biol* **8**: 664-673.
- Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M.L., and Cormack, B.P. (2005) A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* **8**: 378-384.
- Kaur, R., Ma, B., and Cormack, B.P. (2007) A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7628-7633.
- Korshunov, S.S., and Imlay, J.A. (2002) A potential role for periplasmic superoxide dismutase in blocking the penetration of external superoxide into the cytosol of Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **43**: 95-106.
- Li, L., Redding, S., and Dongari-Bagtzoglou, A. (2007) *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res* **86**: 204-215.
- Liu, Y., Adachi, M., Zhao, S., Hareyama, M., Koong, A.C., Luo, D., Rando, T.A., Imai, K., and Shinomura, Y. (2009) Preventing oxidative stress: a new role for *XBP1*. *Cell Death Differ* **16**: 847-857.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.
- Longo, V.D., and Kennedy, B.K. (2006) Sirtuins in aging and age-related disease. *Cell* **126**: 257-268.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953-961.
- Lopilato, J., Bortner, S., and Beckwith, J. (1986) Mutations in a new chromosomal gene of *Escherichia coli* K-12, *pcnB*, reduce plasmid copy number of pBR322 and its derivatives. *Mol Gen Genet* **205**: 285-290.
- Lyman, C.A., and Walsh, T.J. (1994) Phagocytosis of medically important yeasts by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **62**: 1489-1493.
- Ma, B., Pan, S.J., Zupancic, M.L., and Cormack, B.P. (2007) Assimilation of NAD(+) precursors in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **66**: 14-25.
- Ma, B., Pan, S.J., Domergue, R., Rigby, T., Whiteway, M., Johnson, D., and Cormack, B.P. (2009) High affinity transporters for NAD⁺ precursors in *Candida glabrata* are regulated by Hst1 and induced in response to niacin limitation. *Mol Cell Biol*.

- MacCallum, D.M., Findon, H., Kenny, C.C., Butler, G., Haynes, K., and Odds, F.C. (2006) Different consequences of *ACE2* and *SWI5* gene disruptions for virulence of pathogenic and nonpathogenic yeasts. *Infect Immun* **74**: 5244-5248.
- Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H., and Frohlich, K.U. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **145**: 757-767.
- Mai, B., and Breeden, L. (1997) Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi4/Mbp1 family. *Mol Cell Biol* **17**: 6491-6501.
- Manzano-Gayosso, P., Mendez-Tovar, L.J., Hernandez-Hernandez, F., and Lopez-Martinez, R. (2008) [Antifungal resistance: an emerging problem in Mexico]. *Gac Med Mex* **144**: 23-26.
- McCord, R., Pierce, M., Xie, J., Wonkatal, S., Mickel, C., and Vershon, A.K. (2003) Rfm1, a novel tethering factor required to recruit the Hst1 histone deacetylase for repression of middle sporulation genes. *Mol Cell Biol* **23**: 2009-2016.
- Mead, J., McCord, R., Youngster, L., Sharma, M., Gartenberg, M.R., and Vershon, A.K. (2007) Swapping the gene-specific and regional silencing specificities of the Hst1 and Sir2 histone deacetylases. *Mol Cell Biol* **27**: 2466-2475.
- Min, J., Landry, J., Sternglanz, R., and Xu, R.M. (2001) Crystal structure of a *SIR2* homolog-NAD complex. *Cell* **105**: 269-279.
- Missall, T.A., Lodge, J.K., and McEwen, J.E. (2004) Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot Cell* **3**: 835-846.
- Miyazaki, H., Miyazaki, Y., Geber, A., Parkinson, T., Hitchcock, C., Falconer, D.J., Ward, D.J., Marsden, K., and Bennett, J.E. (1998) Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, *PDH1*, in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1695-1701.
- Moriya, H., and Johnston, M. (2004) Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1572-1577.
- Muller, I., Zimmermann, M., Becker, D., and Flomer, M. (1980) Calendar life span versus budding life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mech Ageing Dev* **12**: 47-52.
- Nagy, Z., Montigny, C., Leverrier, P., Yeh, S., Goffeau, A., Garrigos, M., and Falson, P. (2006) Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification. *Biochimie* **88**: 1665-1671.
- Nakayama, H., Tanabe, K., Bard, M., Hodgson, W., Wu, S., Takemori, D., Aoyama, T., Kumaraswami, N.S., Metzler, L., Takano, Y., Chibana, H., and Niimi, M. (2007) The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene *CgAUS1* protects cells against azoles in the presence of serum. *J Antimicrob Chemother* **60**: 1264-1272.
- Nessa, K., Johansson, A., Jarstrand, C., and Camner, P. (1997) Alveolar macrophage reaction to *Candida* species. *Lett Appl Microbiol* **25**: 181-185.
- Niu, W., Li, Z., Zhan, W., Iyer, V.R., and Marcotte, E.M. (2008) Mechanisms of cell cycle control revealed by a systematic and quantitative overexpression screen in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet* **4**: e1000120.
- Okazaki, S., Tachibana, T., Naganuma, A., Mano, N., and Kuge, S. (2007) Multistep disulfide bond formation in Yap1 is required for sensing and transduction of H₂O₂ stress signal. *Mol Cell* **27**: 675-688.
- Ortiz, D.F., St Pierre, M.V., Abdulmessih, A., and Arias, I.M. (1997) A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. *J Biol Chem* **272**: 15358-15365.
- Ozcan, S., Dover, J., and Johnston, M. (1998) Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **17**: 2566-2573.

- Pahlman, A.K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S., and Adler, L. (2001) The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem* **276**: 3555-3563.
- Parkinson, T., Falconer, D.J., and Hitchcock, C.A. (1995) Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1696-1699.
- Pasko, M.T., Piscitelli, S.C., and Van Slooten, A.D. (1990) Fluconazole: a new triazole antifungal agent. *Dicp* **24**: 860-867.
- Perrone, G.G., Tan, S.X., and Dawes, I.W. (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1783**: 1354-1368.
- Petit, T., Diderich, J.A., Kruckeberg, A.L., Gancedo, C., and Van Dam, K. (2000) Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **182**: 6815-6818.
- Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.
- Pinto, E., Ribeiro, I.C., Ferreira, N.J., Fortes, C.E., Fonseca, P.A., and Figueiral, M.H. (2008) Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in *Candida* species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. *J Oral Pathol Med* **37**: 587-592.
- Piper, P., Mahe, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Muhlbauer, M., Coote, P., and Kuchler, K. (1998) The pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *Embo J* **17**: 4257-4265.
- Polakova, S., Blume, C., Zarate, J.A., Mentel, M., Jorck-Ramberg, D., Stenderup, J., and Piskur, J. (2009) Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2688-2693.
- Quinn, M.T., and Gauss, K.A. (2004) Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* **76**: 760-781.
- Ragu, S., Faye, G., Iraqui, I., Masurel-Heneman, A., Kolodner, R.D., and Huang, M.E. (2007) Oxygen metabolism and reactive oxygen species cause chromosomal rearrangements and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 9747-9752.
- Regenberg, B., Holmberg, S., Olsen, L.D., and Kielland-Brandt, M.C. (1998) Dip5p mediates high-affinity and high-capacity transport of L-glutamate and L-aspartate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **33**: 171-177.
- Rhee, S.G. (2006) Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* **312**: 1882-1883.
- Rockenfeller, P., and Madeo, F. (2008) Apoptotic death of ageing yeast. *Exp Gerontol* **43**: 876-881.
- Roetzer, A., Gregori, C., Jennings, A.M., Quintin, J., Ferrandon, D., Butler, G., Kuchler, K., Ammerer, G., and Schuller, C. (2008) *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors. *Mol Microbiol* **69**: 603-620.
- Rosas-Hernandez, L.L., Juarez-Reyes, A., Arroyo-Helguera, O.E., De Las Penas, A., Pan, S.J., Cormack, B.P., and Castano, I. (2008) yKu70/yKu80 and Rif1 regulate silencing differentially at telomeres in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* **7**: 2168-2178.
- Ruan, S.Y., Lee, L.N., Jerng, J.S., Yu, C.J., and Hsueh, P.R. (2008) *Candida glabrata* fungaemia in intensive care units. *Clin Microbiol Infect* **14**: 136-140.
- Sanglard, D., Ischer, F., and Bille, J. (2001) Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1174-1183.

- Sanguinetti, M., Posteraro, B., Fiori, B., Ranno, S., Torelli, R., and Fadda, G. (2005) Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 668-679.
- Sauve, A.A., Wolberger, C., Schramm, V.L., and Boeke, J.D. (2006) The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* **75**: 435-465.
- Scandalios, J.G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* **38**: 995-1014.
- Schaller, M., Schackert, C., Korting, H.C., Januschke, E., and Hube, B. (2000) Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol* **114**: 712-717.
- Schmitt, A.P., and McEntee, K. (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5777-5782.
- Schreve, J.L., Sin, J.K., and Garrett, J.M. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* YCC5 (YCL025c) gene encodes an amino acid permease, Agp1, which transports asparagine and glutamine. *J Bacteriol* **180**: 2556-2559.
- Schreve, J.L., and Garrett, J.M. (2004) Yeast Agp2p and Agp3p function as amino acid permeases in poor nutrient conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **313**: 745-751.
- Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27.
- Singleton, C.K. (1997) Identification and characterization of the thiamine transporter gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **199**: 111-121.
- Spitzner, A., Perzlmaier, A.F., Geillinger, K.E., Reihl, P., and Stolz, J. (2008) The proline-dependent transcription factor Put3 regulates the expression of the riboflavin transporter MCH5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **180**: 2007-2017.
- Stead, D., Findon, H., Yin, Z., Walker, J., Selway, L., Cash, P., Dujon, B.A., Hennequin, C., Brown, A.J., and Haynes, K. (2005) Proteomic changes associated with inactivation of the *Candida glabrata* ACE2 virulence-moderating gene. *Proteomics* **5**: 1838-1848.
- Steinkraus, K.A., Kaeberlein, M., and Kennedy, B.K. (2008) Replicative aging in yeast: the means to the end. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 29-54.
- Strand, M.K., Stuart, G.R., Longley, M.J., Graziewicz, M.A., Dominick, O.C., and Copeland, W.C. (2003) *POS5* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a mitochondrial NADH kinase required for stability of mitochondrial DNA. *Eukaryot Cell* **2**: 809-820.
- Taschdjian, C.L., Kozinn, P.J., and Toni, E.F. (1970) Opportunistic yeast infections, with special reference to candidiasis. *Ann N Y Acad Sci* **174**: 606-622.
- Teixeira, M.C., Dias, P.J., Simoes, T., and Sa-Correia, I. (2008) Yeast adaptation to mancozeb involves the up-regulation of FLR1 under the coordinate control of Yap1, Rpn4, Pdr3, and Yrr1. *Biochem Biophys Res Commun* **367**: 249-255.
- Temple, M.D., Perrone, G.G., and Dawes, I.W. (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* **15**: 319-326.
- Thakur, J.K., Arthanari, H., Yang, F., Pan, S.J., Fan, X., Breger, J., Frueh, D.P., Gulshan, K., Li, D.K., Mylonakis, E., Struhl, K., Moye-Rowley, W.S., Cormack, B.P., Wagner, G., and Naar, A.M. (2008) A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* **452**: 604-609.
- Torelli, R., Posteraro, B., Ferrari, S., La Sorda, M., Fadda, G., Sanglard, D., and Sanguinetti, M. (2008) The ATP-binding cassette transporter-encoding gene *CgSNQ2* is contributing to the *CgPDR1*-dependent azole resistance of *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **68**: 186-201.

- Trick, W.E., Fridkin, S.K., Edwards, J.R., Hajjeh, R.A., and Gaynes, R.P. (2002) Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* **35**: 627-630.
- Tsai, H.F., Krol, A.A., Sarti, K.E., and Bennett, J.E. (2006) *Candida glabrata* PDR1, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1384-1392.
- Vandenbol, M., Jauniaux, J.C., and Grenson, M. (1989) Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* PUT4 proline-permease-encoding gene: similarities between CAN1, HIP1 and PUT4 permeases. *Gene* **83**: 153-159.
- Vargas, R.C., Garcia-Salcedo, R., Tenreiro, S., Teixeira, M.C., Fernandes, A.R., Ramos, J., and Sa-Correia, I. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance transporter Qdr2 is implicated in potassium uptake, providing a physiological advantage to quinidine-stressed cells. *Eukaryot Cell* **6**: 134-142.
- Veal, E.A., Ross, S.J., Malakasi, P., Peacock, E., and Morgan, B.A. (2003) Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J Biol Chem* **278**: 30896-30904.
- Veal, E.A., Day, A.M., and Morgan, B.A. (2007) Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* **26**: 1-14.
- Vermitsky, J.P., and Edlind, T.D. (2004) Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3773-3781.
- Vermitsky, J.P., Earhart, K.D., Smith, W.L., Homayouni, R., Edlind, T.D., and Rogers, P.D. (2006) Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol Microbiol* **61**: 704-722.
- Verwaal, R., Arako, M., Kapur, R., Verkleij, A.J., Verrips, C.T., and Boonstra, J. (2004) HXT5 expression is under control of STRE and HAP elements in the HXT5 promoter. *Yeast* **21**: 747-757.
- Vivancos, A.P., Jara, M., Zuin, A., Sanso, M., and Hidalgo, E. (2006) Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways. *Mol Genet Genomics* **276**: 495-502.
- Wada, S., Tanabe, K., Yamazaki, A., Niimi, M., Uehara, Y., Niimi, K., Lamping, E., Cannon, R.D., and Monk, B.C. (2005) Phosphorylation of *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporter Cdr1p regulates drug efflux activity and ATPase stability. *J Biol Chem* **280**: 94-103.
- Watt, R., and Piper, P.W. (1997) UBI4, the polyubiquitin gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is a heat shock gene that is also subject to catabolite derepression control. *Mol Gen Genet* **253**: 439-447.
- Wei, M., Fabrizio, P., Hu, J., Ge, H., Cheng, C., Li, L., and Longo, V.D. (2008) Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet* **4**: e13.
- Wellington, M., Dolan, K., and Krysan, D.J. (2009) Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infect Immun* **77**: 405-413.
- Werner, E. (2004) GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci* **117**: 143-153.
- Wolfe, K.H., and Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**: 708-713.
- Xie, J., Pierce, M., Gailus-Durner, V., Wagner, M., Winter, E., and Vershon, A.K. (1999) Sum1 and Hst1 repress middle sporulation-specific gene expression during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **18**: 6448-6454.

- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2007) Permeases recycle amino acids resulting from autophagy. *Autophagy* **3**: 149-150.
- Yenush, L., Mulet, J.M., Arino, J., and Serrano, R. (2002) The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *Embo J* **21**: 920-929.
- Zhang, N., Wu, J., and Oliver, S.G. (2009) Gis1 is required for transcriptional reprogramming of carbon metabolism and the stress response during transition into stationary phase in yeast. *Microbiology* **155**: 1690-1698.

8. ANEXOS

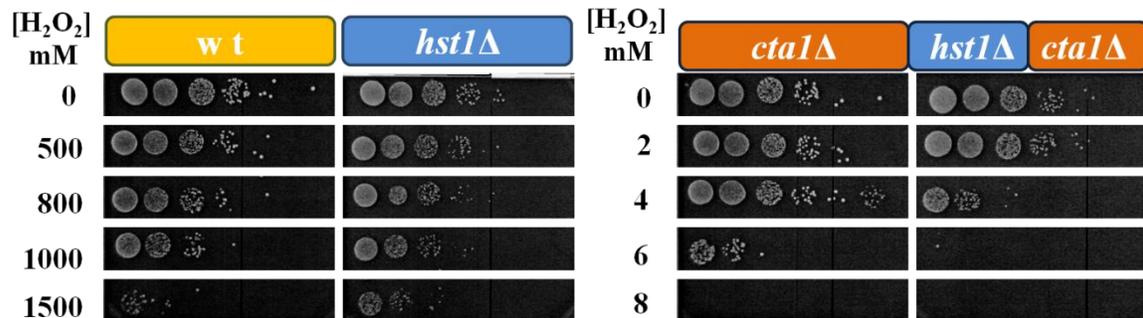


Figura S1. La ausencia de *HST1* aparentemente incrementa la respuesta antioxidante en fase estacionaria. La cepa silvestre (BG14) y las mutantes *hst1*Δ (CGM84), *cta1*Δ (CGM295) y la doble mutante *hst1*Δ*cta1*Δ (CGM323) se crecieron por 48 horas hasta OD_{600nm}=30. Las células se diluyeron con medio usado a una OD_{600nm}=0,5 y fueron expuestas a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (500, 800, 100 y 1500 mM). Después de tres horas, se tomaron cantidades equivalentes de OD_{600nm}=0,5 y se gotearon diluciones seriadas en medio YPD. Tal como en fase exponencial, la catalasa es imprescindible para la resistencia en fase estacionaria de la cepa silvestre y de la mutante *hst1*Δ. Sin embargo, al parecer la ausencia conjunta de Hst1p y Cta1p, incrementa la sensibilidad a peróxido de hidrógeno.

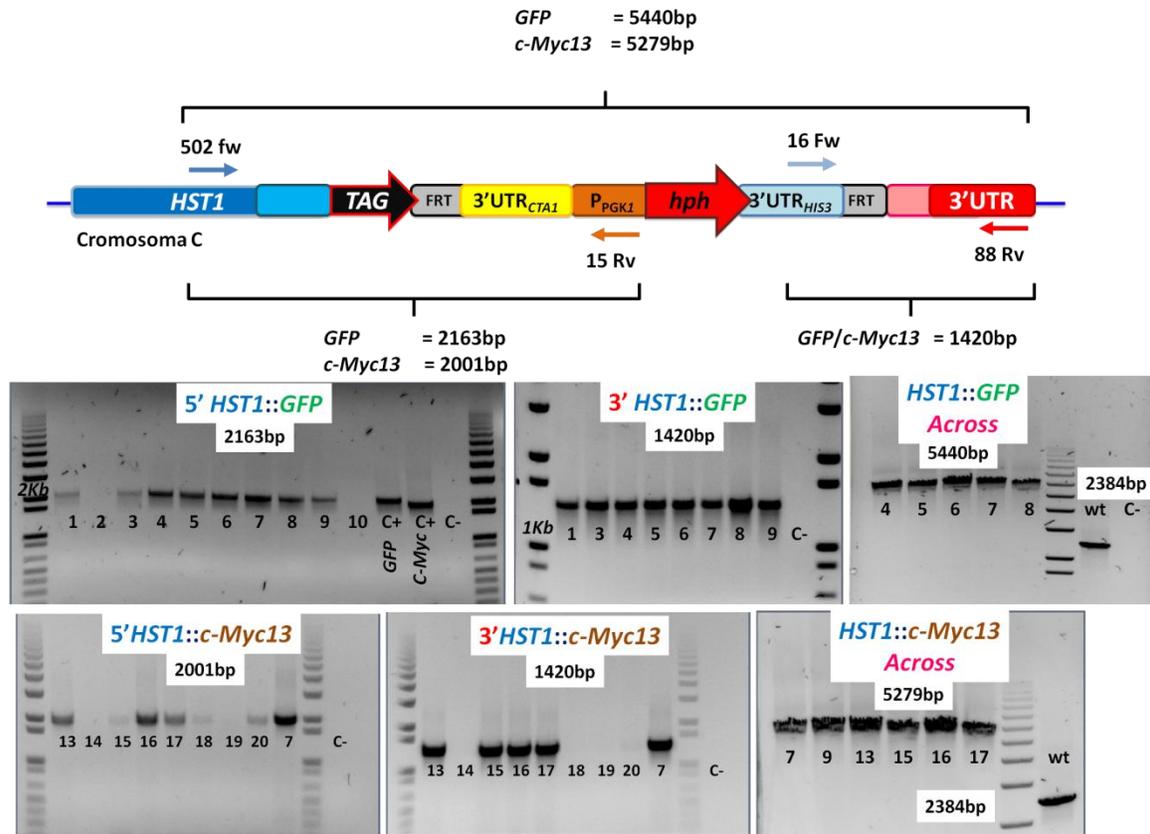


Figura S3. Diagnóstico por PCR de los reemplazos génicos de *HST1* con las fusiones traduccionales. Para verificar que la recombinación con los insertos derivados de pOZ30 y pOZ32 ocurrió en el locus correcto, se extrajo el ADN de colonias resistentes a higromicina y se usó como molde en tres reacciones diagnósticas de PCR. Los oligonucleótidos #502 y #15 se emplearon para amplificar el extremo 5' y la pareja #16 con #88 para el extremo 3'. Con los oligonucleótidos de los extremos (#502 y #88) se comprobó que todo el inserto se encuentra en el locus.